

# Funktion und Regulation des neuen Tubulin- assoziierten Proteins RITA



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

Vom Fachbereich Chemie  
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation  
von  
Dipl.-Ing. Kerstin Steinhäuser  
aus Offenbach am Main

Referenten: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferentin: Prof. Dr. Juping Yuan

Tag der Einreichung: 12. Oktober 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Januar 2017

Darmstadt 2017

**D 17**

---

---

*„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.“*

Albert Einstein

---

## Inhalt

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DER ZELLZYKLUS IM ÜBERBLICK.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die Mitose .....	3
1.1.2	Die bipolare mitotische Spindel.....	4
<b>1.2</b>	<b>MIKROTUBULI ASSOZIIERTE PROTEINE.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>AUFBAU UND POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON MIKROTUBULI.....</b>	<b>7</b>
1.3.1	Aufbau und Eigenschaften von Mikrotubuli .....	7
<b>1.4</b>	<b>POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN DER MIKROTUBULI .....</b>	<b>10</b>
1.4.1	Mikrotubuli und Krebs .....	12
<b>1.5</b>	<b>RITA (RBP-J INTERACTING AND TUBULIN ASSOCIATED).....</b>	<b>14</b>
<b>1.6</b>	<b>ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN DISSERTATION .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE .....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Chemikalien.....	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.3	Laborgeräte .....	17
2.1.4	Software.....	18
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.6	Bakterienstämme und Enzyme .....	23
2.1.7	Antikörper.....	24
2.1.8	Zelllinien.....	25
2.1.9	siRNA .....	25
<b>2.2</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN.....</b>	<b>27</b>
2.2.1	Herstellung kompetenter Zellen .....	27
2.2.2	Transformation von Plasmid-DNA.....	27
2.2.3	DNA-Isolierung .....	28
2.2.4	Klonierung und Punkt-Mutagenese .....	28
2.2.5	Expression von Proteine in Bakterien.....	29
<b>2.3</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN .....</b>	<b>30</b>
2.3.1	Allgemeine Zellkulturarbeiten.....	30
2.3.2	Synchronisation der Zellen und Inhibitor Behandlungen.....	30
2.3.3	Proteinstabilität .....	31
2.3.4	Transfektion von Plasmid-DNA .....	31
2.3.5	Transfektion von siRNA.....	31
2.3.6	Time-lapse Mikroskopie.....	32
2.3.7	MT-assay .....	33
2.3.8	Tubulin regrowth assay.....	33
<b>2.4</b>	<b>PROTEINCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN .....</b>	<b>34</b>
2.4.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	34
2.4.2	SDS Gelelektrophorese und Western-Blot .....	34
2.4.3	Co-Immunopräzipitation.....	35

2.4.4 Pull-down Assay .....	36
2.4.5 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	36
2.4.6 Durchflusszytometrie: Zellzyklus.....	37
2.4.7 In vitro MT Depolymerisations assay.....	37
2.4.8 MT-Fraktionierung .....	38
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>3.1 DIE ROLLE VON RITA IN DER MITOSE.....</b>	<b>39</b>
3.1.1 RITA ist assoziiert mit mitotischen Strukturen und Tubulin.....	39
3.1.2 RITA ist während des Zellzykluses exprimiert und bindet an Tubulin.....	41
<b>3.2 DIE DEPLETION VON RITA BEEINFLUSST DIE ZELLZYKLUS PROGRESSION .....</b>	<b>43</b>
3.2.1 Zellen ohne RITA zeigen einen veränderten Zellzyklus .....	43
3.2.2 Zellen ohne RITA zeigen einen verzögerten Austritt aus der Mitose .....	44
3.2.3 Time-lapse Mikroskopie zeigt verlängerte mitotische Sub-Phasen.....	45
3.2.4 Fibroblasten aus RITA KO-Mäusen zeigten fehlerhafte Chromosomenanordnung und Multipolarität .....	51
3.2.5 Wild-Typ RITA aber nicht RITA $\Delta$ tub korrigieren die mitotischen Defekte .....	52
<b>3.3 RITA UND MT-DYNAMIK .....</b>	<b>54</b>
3.3.1 Zellen ohne RITA besitzen ein erhöhtes Level an polymerisiertem Tubulin und verkürzte Spindeln .....	54
3.3.2 RITA ist in die MT Dynamik involviert.....	55
3.3.3 Fibroblasten aus RITA KO Mäusen zeigen verändertes MT-Verhalten .....	56
3.3.4 Zellen ohne RITA haben stabilere Kinetochor-MTs .....	57
3.3.5 Depletion von RITA erhöht den Gehalt an acetyliertem $\alpha$ -Tubulin.....	58
3.3.6 RITA kolokalisiert mit acetyliertem $\alpha$ -Tubulin.....	60
3.3.7 Rescue mit Wildtyp-RITA aber nicht RITA $\Delta$ tub verringert die Menge an acetyliertem $\alpha$ -Tubulin .....	61
3.3.8 RITA beeinflusst die Assoziation von HDAC6 und Mec-17 mit $\alpha$ -Tubulin.....	63
3.3.9 Depletion von RITA erhöht das Level an aktiver Aurora A an den Spindel-Polen und Zentrosomen .....	67
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 RITA ASSOZIIERT MIT DER MITOTISCHEN SPINDEL .....</b>	<b>73</b>
4.1.1 RITA wird im Zellzyklus und der Mitose reguliert.....	74
4.1.2 Der Ablauf des Zellzyklus ist in Abwesenheit von RITA gestört.....	75
4.1.3 Fehlregulation von RITA und die Folgen für die Zellzyklus Progression .....	77
<b>4.2 RITA BEEINFLUSST DEN SPINDEL-PHÄNOTYP UND DIE MT-DYNAMIK .....</b>	<b>79</b>
4.2.1 RITA moduliert die Acetylierung von $\alpha$ -Tubulin.....	81
4.2.2 RITA hat einen Einfluss auf die Komplexbildung von HDAC6/Mec-17 mit Tubulin .....	82
<b>4.3 ERHÖHTES AURORA A LEVEL IN ZELLEN OHNE RITA IST PARTIELL FÜR DIE CHROMOSOMENDEFEKTE VERANTWORTLICH.....</b>	<b>84</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVE .....</b>	<b>86</b>
<b>6 LITERATUR.....</b>	<b>90</b>

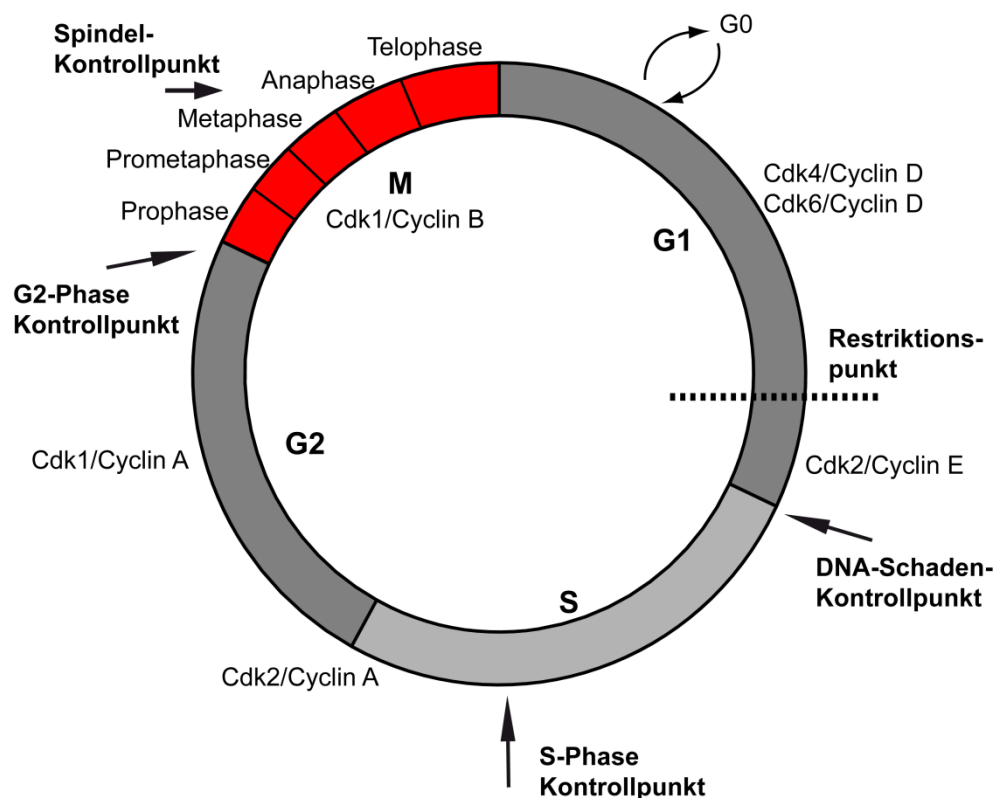
---

<b>7</b>	<b>VERZEICHNISSE.....</b>	<b>102</b>
<b>7.1</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>
<b>7.2</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>103</b>
<b>7.3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNISS .....</b>	<b>104</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>106</b>
<b>8.1</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>106</b>
<b>8.3</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>108</b>
<b>8.4</b>	<b>PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>109</b>
<b>8.5</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>110</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Zellzyklus im Überblick

Im Jahre 1855 begründete Rudolf Virchow die moderne Zelltheorie: „*omnis cellula e cellula*“, durch Teilung bestehender Zellen entstehen neue Zellen (Rudolf Virchow, 1858). Walther Flemming prägte im Jahr 1882 den Begriff „Mitose“ für die Zellteilung und erkannte gewisse Strukturen welche auf die neu entstehenden Zellen im gleichen Maße verteilt werden (Flemming, 1882). Einige Jahre später wurden diese Strukturen (Chromosomen) von Avery *et al.* experimentell als die Träger der Erbinformation identifiziert (Avery et al., 1944). Dieses Erkenntnis belegt, dass die Zellteilung als Ziel die Generierung zwei genetisch gleicher Tochterzellen hat. Der Zellzyklus wird in folgende diskrete Phasen unterteilt: G1- (G=Gap), S- (S=DNA-Synthese), G2- und M-Phase (Mitose).



**Abbildung 1-1:** Die Phasen des Zellzyklus im Überblick: G1, S, G2 und M (rot). Die jeweiligen Kontrollpunkte sind gezeigt. Die verschiedenen Cdk/Cyclin-Komplexe, die während der einzelnen Phasen aktiv sind, sind dargestellt (in Anlehnung an Garrett, 2001).

---

Dabei unterteilt sich die Mitose in Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase und schließt mit der Zytokinese ab (Abbildung 1-1). Zwischen der S-Phase (DNA Replikation) und der M-Phase (DNA Teilung) gibt es die G1- und die G2-Phase. Die G1-Phase folgt direkt auf die Mitose und in dieser Phase ist die Zelle empfänglich für positive sowie negative Wachstumssignale. In der G2-Phase, welche direkt auf die S-Phase folgt, bereitet sich die Zelle auf die Mitose vor. Schließlich gibt es noch eine fünfte Phase, die G0-Phase (quieszente Zelle). In dieser Phase kann die Zelle reversibel aus G1 treten, wenn nicht genügend wachstumsfördernde Signale vorherrschen oder die Zelle ausdifferenziert vorliegt (Michelle D. Garrett, 2001). Stehen der Zelle wieder genug Mitogene zur Verfügung, verlässt diese den G0-Zustand und tritt wieder in die G1-Phase ein. An diesem Punkt kann die Zelle dann ohne weitere mitogene Stimuli proliferieren, und dieser Punkt wurde von Arthur Pardee 1974 als Restriktionspunkt oder auch „*point of no return*“ definiert (Pardee, 1974). Für die Progression des Zellzyklus ist eine Familie der Serin/Threonin Kinasen, die Cyclin abhängigen Kinasen (Cdks), essentiell wichtig (Morgan, 1997). Ihre Aktivität hängt von der Assoziation mit den regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen ab. Die Aufgabe der Cdks ist die Kontrolle des Zellzyklus durch Phosphorylierung von Zellzyklusspezifischen Proteinen (Garrett, 2001). Das Retinoblastoma-Tumorsuppressorgen pRb ist ein Schlüsselregulator der G1-Phase und besitzt 16 potentielle Phosphorylierungsstellen für Cdk (Taya, 1997). In der frühen G1-Phase liegt pRb in einem hypophosphorylierten Zustand vor und reprimiert dadurch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, welche für die Expression von S-Phase Genen zuständig sind (J. William Harbour and Douglas C. Dean, 2000). Durch die Phosphorylierung von pRb durch Cdk in der G1-Phase, wird die Bindung zu E2F-Proteinen gelöst und die E2F-abhängige Transkription findet statt. Dies ist erforderlich, um den Restriktionspunkt in der späten G1-Phase zu passieren (Garrett, 2001). Die Phosphorylierung wird von Cdk4/Cyclin D und Cdk6/Cyclin D initiiert. Dadurch löst sich die Bindung von pRb mit Histone-Deacetylasen und Cyclin E wird exprimiert und der aktive Komplex aus Cdk2/Cyclin E gebildet. Dieser phosphoryliert dann pRb weiter und die Bindung zu E2F wird vollständig gelöst, wobei dies die Transkription voran treibt und die Zelle von G1 in die S-Phase treten kann (William Harbour und Dean, 2000). Wenn die Zelle in die S-Phase tritt, wird Cyclin A exprimiert und assoziiert mit Cdk2. Somit können dann neue Substrate von Cdk2/Cyclin A phosphoryliert werden (Michelle D. Garrett, 2001). Zu diesen Substraten gehört Cdc6, welches die Replikation initiiert und vom Nukleus in das Zytoplasma und zu E2F relokalisiert. Die Progression von der G2-Phase in die Mitose benötigt dann die Aktivität von Cdk1/Cyclin B1. Dieser Komplex phosphoryliert eine Vielzahl an Proteinen, welche in der Mitose reguliert werden (Nigg, 1995).

---

Die Duplikation und Trennung der Chromosomen muss hoch präzise ablaufen. Das Fehlen oder das Vorhandensein zu vieler Chromosomen in einem Chromosomensatz kann zu Aneuploidie führen. Die daraus resultierenden Konsequenzen für die Zellen sind die Apoptose oder das unkontrollierte Zellwachstum, welches zur Tumorentstehung beitragen kann. Deshalb besitzen Zellen sogenannte Kontrollpunkte (*checkpoints*), welche sicherstellen, dass Fehler während des Zellzyklus repariert werden oder die Zelle den Zelltod findet. Die wichtigen Kontrollpunkte in Eukaryoten sind der DNA-Schadenskontrollpunkt am Ende der G1-Phase, der G2-DNA-Schadenskontrollpunkt am G2/M Übergang und der Spindelaufbau-Kontrollpunkt (*spindle assembly checkpoint* SAC) in der Mitose (Gorbsky, 2001; Murray, 1992). Dabei kontrolliert der DNA-Schadenskontrollpunkt das genetische Material auf Fehler, bevor die Zelle in die S-Phase übergeht. In Eukaryonten verhindert der Spindelaufbau-Kontrollpunkt (SAC) die fehlerhafte Chromosomensegregation, welche zu Aneuploidie führen kann. Die Fehlregulation dieses Kontrollpunktes hat dramatische Folgen und ist an der Tumorentstehung beteiligt (Musacchio und Salmon, 2007).

---

### 1.1.1 Die Mitose

---

Die Mitose unterteilt sich in folgende Unterphasen: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase. In der Prophase kondensiert das Chromatin und einzelne Chromosomen werden sichtbar (Civelekoglu-Scholey und Cimini, 2014). Die Frequenz der Mikrotubuli-(MT)-Polymerisation und Depolymerisation nimmt zu und fördert damit die Interaktion zwischen den dynamischen Plus-Enden der MTs mit den kondensierten Chromosomen (Civelekoglu-Scholey and Cimini, 2014; Compton, 2000; Gadde and Heald, 2004; Kirschner MW, 1986). Während der Prometaphase wird die Kernhülle vorübergehend aufgelöst und einige MTs wachsen von den Zentrosomen aus und verbinden sich mit den Kinetochoren eines duplizierten Chromatids. In vielen Modellorganismen binden einzelne Kinetochore mehrere Mikrotubuli und bilden somit die als Kinetochor-Faser oder *K-fiber* bezeichneten MT-Bündel aus. Typischerweise liegen Chromosomen zuerst in der monotelischen Anordnung vor, das heißt, dass ein Schwester-Kinetochor gebunden an MTs und eins ungebunden vorliegt. Diese Kinetochore können amphitelisch verknüpft werden, genauer, beide Schwester-Kinetochor sind an die Mikrotubuli des entgegengesetzten Pols gebunden und können sich somit auf den Spindel-Äquator bewegen (Cai et al., 2009a; Kapoor et al., 2006). Dieser Prozess der progressiven amphitelischen Verknüpfung der Chromosomen



---

und die Ausrichtung in der Spindel-Äquatorplatte, nennt man Chromosomen *congression* (Civelekoglu-Scholey und Cimini, 2014). Nachdem alle Chromosomen in der Spindel-Äquatorplatte ausgerichtet sind, befindet sich die Zelle in der Metaphase und die Ausbildung der Metaphaseplatte findet statt. In vielen Zelltypen oszillieren die Chromosomen in der Metaphaseplatte kontinuierlich um den Spindel-Äquator (Skibbens et al., 1993). Die Anaphase setzt durch die abrupte und synchrone Trennung der Schwesterchromatide aufgrund des Auflösens des Cohesin-Komplexes zwischen den Schwesterchromatiden ein (Blow and Tanaka, 2005).

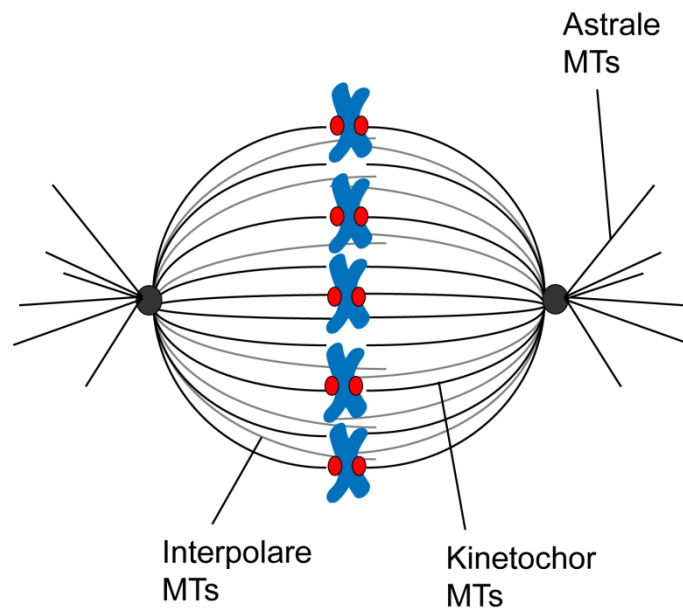
Während der Anaphase, bewegen sich die beiden Schwesterchromatide auf die gegenüberliegenden Spindelpole durch die Verkürzung ihrer jeweiligen *K-fibers* zu. Dieser Vorgang wird auch als Anaphase A bezeichnet und ist von der Anaphase B zu unterscheiden, in welcher sich die Spindel-MTs weiter verlängern, so dass die Chromosomen weiter auseinanderrücken. In der Telophase haben die Chromosomen die Spindelpolregionen erreicht, und beginnen zu dekontensieren. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Bildung der Kernhülle um die dekontensierenden Chromosomen, um die zwei identischen Tochterzellen zu trennen. Die Zytokinese beginnt während der späten Anaphase/Telophase durch die Bildung einer Teilungsfurche, welche aus einem Aktin-Myosin kontraktilen Ring besteht. Dieser Prozess teilt das Zytoplasma vollständig, wodurch die Zellteilung abgeschlossen ist (Civelekoglu-Scholey and Cimini, 2014).

---

### 1.1.2 Die bipolare mitotische Spindel

---

Die Hauptfunktion der mitotischen Spindel ist die akkurate Trennung der Geschwister-Chromatide nach der G2-Phase durch den Aufbau eines bipolaren Arrangements von verschiedenen Mikrotubuli-(MT)-Populationen (Gatlin und Bloom, 2010). Innerhalb der Spindel wird zwischen drei verschiedenen Typen von Mikrotubuli unterschieden: Die astralen Mikrotubuli verbinden die Spindelpole mit dem Zellkortex und sind für die Polarisation zuständig, interpolare Mikrotubuli sind antiparallel mit den interpolaren Mikrotubuli des gegenüberliegenden Spindelpols angeordnet, Kinetochor-Mikrotubuli (K-MTs oder *k-fibers*), verbinden die Kinetochore mit den Mikrotubuli der Spindelpole für die akkurate Trennung der Chromosomen (Abbildung 1-2) (Compton, 2000; Sharp et al., 2000).



**Abbildung 1-2:** Schematischer Aufbau der mitotischen Spindel. Die mitotische Spindel besteht aus interpolaren, astralen und Kinetochor-Mikrotubuli. Die Plus-Enden sind zur Spindelmittlinie ausgerichtet und die Minus-Enden zu den Zentrosomen. Die Kinetochor-Mikrotubuli sind mit den Chromosomen verknüpft

Die Nukleation der Mikrotubuli zum Aufbau einer bipolaren Spindel erfolgt prinzipiell an den Zentrosomen, dem sogenannten Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) (Wittmann et al., 2001). Dieses MTOC liegt in der perinukleären Region, die zwei Zentriolen, bestehend aus neun Tripletts an Mikrotubuli enthält. Die Zentriolen sind von einem elektronendichten perizentriolaren Material umgeben (PCM), in dem Proteine enthalten sind, die für die Nukleation und Organisation der MTs zuständig sind. Darunter befindet sich  $\gamma$ -Tubulin, das mit anderen Proteinen den  $\gamma$ -TuRC-Komplex (*Tubulin Ring Complex*) bildet (Hannak et al., 2002). Für den Aufbau der bipolaren mitotischen Spindel übernimmt auch die zentrosomale Aurora A Kinase eine wichtige Funktion (Sardon et al., 2008). Diese Kinase kann durch Autophosphorylierung aktiviert werden, dennoch sind andere Aktivatoren wie TPX2 (*Targeting protein for Xklp2*) zusätzlich an der Aktivierung beteiligt (Barr and Gergely, 2007; Gruss and Vernos, 2004). Die Interaktion von TPX2 mit Aurora A schützt den für die Aktivität verantwortlichen T-loop (Thr288) vor Dephosphorylierung durch Protein Phosphatase 1 (PP1) (Bayliss et al., 2003). Aurora A reguliert zudem Proteine, welche für den Aufbau der mitotischen Spindel zuständig sind, wie zum Beispiel Proteine der TACC- (*Transforming acidic coiled-coil-containing proteins*)- und chTOG- (*Cytoskeleton-associated proteins*)-Familie (Barr and Gergely, 2007; Gergely, 2002). Auch andere Proteine, wie das Motorprotein Eg5 (*Kinesin-like protein KIF11*) wird von Aurora A reguliert (Giet et al., 1999). Am Aufbau der mitotischen Spindel sind viele weitere Proteine beteiligt, wie

---

beispielsweise Mikrotubuli assoziierten Proteine, welche im nächsten Kapitel näher beschrieben werden.

---

## 1.2 Mikrotubuli assoziierte Proteine

---

Die grundlegende Struktur der mitotischen Spindel bilden die MTs, deren Dynamik und Organisation von einer Vielzahl an Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) und Motorproteinen reguliert wird (Helmke et al., 2013). MAPs beeinflussen die Wirksamkeit von Chemotherapeutika sowie das Tumorwachstum (Bhat und Setaluri, 2007).

Die am besten studierten stabilisierenden MAPs sind Tau, MAP2 und MAP4, wobei Tau und MAP2 eine wichtige Rolle in Neuronen spielen (De Forges et al., 2012). Tau bindet in seiner dephosphorylierten Form an Tubulin und fördert die Polymerisation und Stabilisation von axonalen Mikrotubuli. Ein veränderter Phosphorylierungsstatus von Tau ist mit neurodegenerativen Erkrankungen (Tauopathien) wie Alzheimer assoziiert (Buée et al., 2000). Durch Phosphorylierung von MAPs, wie Tau, dissoziieren diese von den MTs und ihr stabilisierender Effekt wird aufgehoben (Ebner et al., 1999). Andere MAPs haben dagegen einen destabilisierenden Effekt auf MTs, entweder durch Zerteilen der MTs oder indem sie die Depolymerisation fördern (De Forges et al., 2012). Die drei Proteine Katanin, Spastin und Fidgetin regulieren die Anzahl und die Länge der MTs mittels ihrer Aktivität lange MTs zu zerschneiden (*severing enzymes*) (Zhang et al., 2007). Andere MAPs, wie beispielsweise Stathmin, binden freie Tubulin-Dimere (Belmont und Mitchison, 1996) und fördern dadurch die Guanin-Triphosphat-Hydrolyse und somit die Depolymerisation der MTs (Howell et al., 1999). Proteine der Kinesin-13-Familie, wie MCAK (*Mitotic Centromere-Associated Kinesin*) bewirken eine Konformationsänderung der Tubulin-Dimere und fördern dadurch die Depolymerisationsrate der MTs (Ems-McClung und Walczak, 2010). Eine besondere Klasse der MAPs sind die Plus-TIPs (*MT plus-end tracking proteins*) (Akhmanova und Steinmetz, 2010). Aufgrund ihrer Lokalisation an den Plus-Enden der MTs, spielen Plus-TIPs eine wichtige Rolle bei der Regulation der MT-Dynamik. Sie sind zudem dafür verantwortlich, dass MTs mit den Zentrosomen und dem Zellkortex interagieren können (De Forges et al., 2012). Als erstes Plus-TIP wurde CLIP170 (*cytoplasmic linker protein*) identifiziert (Perez et al., 1999). Seine Inaktivierung induziert den Einbau von GTP-Tubulin-Dimeren und dadurch kommt es zu dem Verlust von p150Glued (*Dynactin subunit 1*) an den Plus-Enden der MTs (Komarova et al., 2002). Die Familie der EB (*End-Binding*) Proteine spielt eine Hauptrolle an den Plus-Enden der MTs. EBs binden dynamisch an die Plus-Enden der MTs, entweder durch

---

Erkennen der GTP-Kappen oder durch Erkennen einer spezifischen strukturellen Konformation des Protofilaments und rekrutierten dann andere Plus-TIPs (De Forges et al., 2012). Die EB Proteine binden ihre Partner über zwei verschiedene Wege. Proteine mit einer CAP-Gly-Domäne (*cytoskeleton-associated protein-glycine-rich*), wie zum Beispiel CLIPs, die mit dem C-Terminus der EBs über das Motiv EEY/F interagieren (Komarova et al., 2005). Andere TIPs wie CLASPs (*CLIP-associated proteins*) und MCAK assoziieren mit dem hydrophoben Serin-reichen Motiv SxIP (Honnappa et al., 2009). Dabei fördern CLASPs die Rekrutierung von Tubulin-Dimeren an das Plus-Ende der MTs, MCAK ist dagegen eine Plus-TIP Depolymerase (Al-Bassam et al., 2010; Newton et al., 2004). Eine andere Familie der Plus-TIPs sind die Proteine der TOG-Familie (*tumor overexpressed gene*), zu denen XMAP215 (*Microtubule-associated protein 215 kDa*) oder sein Homolog Ch-TOG (*Cytoskeleton-associated protein 5*) gehören. Diese Proteine induzieren die Addition von Tubulin-Dimeren an das Plus-Ende der Mikrotubuli und fördert somit deren Wachstum (Brouhard et al., 2008).

---

### 1.3 Aufbau und posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli

---

---

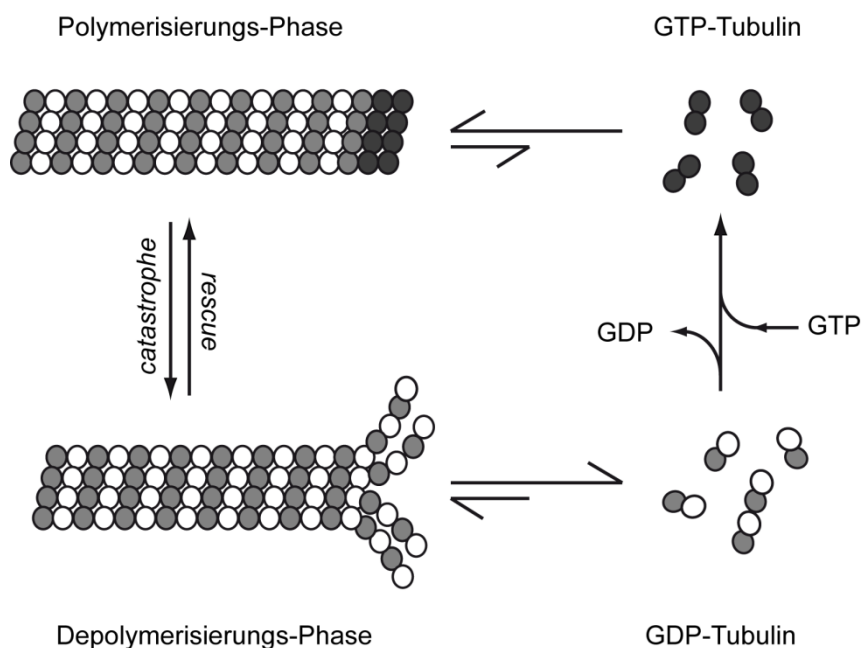
#### 1.3.1 Aufbau und Eigenschaften von Mikrotubuli

---

Die Regulation der Mikrotubuli-Dynamik ist essentiell für viele Prozesse wie die Segregation der Chromosomen in der Mitose, Zell-Migration, intrazellulärer Transport und Zelldifferenzierung (Babet van der Vaart, 2009; Desai und Mitchison, 1997). Mikrotubuli (MTs) formen das zytoplasmatische Netzwerk der Zelle und bestehen  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimereinheiten die hohle zylindrische Polymere bilden (Kirschner, 1986). Das  $\alpha$ -Tubulin eines freien Dimers wird direkt vor das  $\beta$ -Tubulin eines bereits eingebauten Dimers gesetzt (Howard und Hyman 2003). Dadurch entsteht eine polare Orientierung mit zwei unterschiedlichen Enden. Zum Minus-Ende der MTs ist das  $\alpha$ -Tubulin orientiert und  $\beta$ -Tubulin zum sogenannten Plus-Ende. Der Einbau neuer Tubulin-Dimere findet nahezu ausschließlich am dynamischen Plus-Ende statt (Howard und Hyman, 2003). Das weniger dynamische Minus-Ende verbleibt am MTOC und das Plus-Ende polymerisiert vom MTOC weg (Howard und Hyman, 2003; Mitchison, 1984). Beide Dimere,  $\alpha$ -Tubulin als auch  $\beta$ -Tubulin, sind an Guanosin-Triphosphat (GTP) gebunden (Desai und Mitchison, 1997). Während das an  $\alpha$ -Tubulin gebundene GTP geschützt im Dimer vorliegt, ist das an  $\beta$ -Tubulin

gebundene, frei zugänglich und kann somit zu GDP hydrolysiert werden (Howard und Hyman, 2003).

*In vitro* wechseln Mikrotubuli zwischen langsamen Polymerisationsperioden und schnellen Depolymerisationsperioden, ein Verhalten das als dynamische Instabilität von Mitchison und Kirchner beschrieben wurde (Mitchison, 1984). Die dynamische Instabilität (Abbildung 1-3) kann empirisch durch folgende Parameter beschrieben werden: Die Polymerisations- und Depolymerisationsrate, die Dauer den Polymerisations- und Depolymerisationsphase, die Frequenz des Übergangs von Polymerisation zu Depolymerisation (genannt *catastrophe* oder Katastrophe) und die Häufigkeit des Übergangs von der Depolymerisation zur Polymerisation (genannt *rescue* oder Rettung) (Pasquier und Kavallaris, 2008). Die dynamische Instabilität wird durch den Austausch von GTP/GDP vermittelt (Kirschner, 1986). Die  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit ist immer an GTP gebunden und wird bevorzugt polymerisiert. Dagegen ist die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit entweder an GTP oder GDP gebunden und wird somit entweder polymerisiert oder depolymerisiert. Innerhalb der Mikrotubuli wird daher zwischen zwei Enden mit unterschiedlichen dynamischen Eigenschaften differenziert. Das Plus-Ende, dass durch die  $\beta$ -Tubulin-Untereinheit abgeschlossen ist dynamischer als das Minus-Ende das durch die  $\alpha$ -Tubulin-Untereinheit abgeschlossen ist (Pasquier und Kavallaris, 2008).



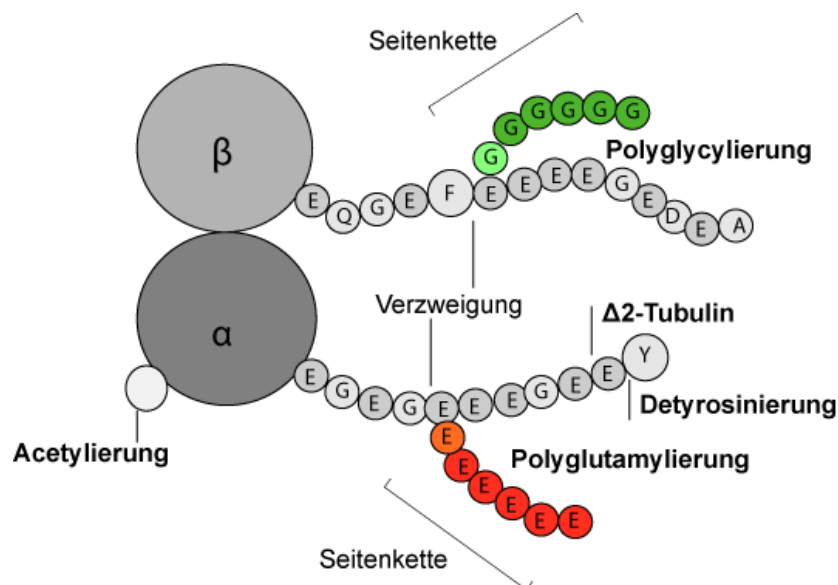
**Abbildung 1-3:** Schematische Darstellung der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli. Mikrotubuli wachsen durch den Einbau von GTP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende (oben links). Der Verlust von GTP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende führt zum „catastrophe“-Ereignis (unten links), woraufhin Mikrotubuli durch den Verlust von GDP-Tubulin Dimeren am Plus-Ende depolymerisieren (unten rechts). Die erneute Anlagerung von GTP-Tubulin am Plus-Ende bewirkt das „rescue“-Ereignis (oben rechts), woraufhin Mikrotubuli wieder polymerisieren.

---

Die MT-Dynamik in Zellen wird sowohl räumlich, als auch zeitlich innerhalb verschiedener Regionen im Zytoplasma von vielen verschiedenen Proteinen reguliert. Während der Mitose ist die MT-Dynamik drastisch erhöht im Vergleich zu Zellen in der Interphase, um die Bildung und Spannung von Kinetochor-Mikrotubuli zu gewährleisten, welche für die korrekte Befestigung, Separation und Segregation der Chromosomen zuständig sind (Honore et al., 2005).

## 1.4 Posttranslationale Modifikationen der Mikrotubuli

Die Struktur der MTs ist zwischen Zelltypen sowie Organismen konserviert und kann durch unterschiedlichste Mechanismen, die noch nicht vollständig verstanden sind, angepasst werden. Zu den möglichen Regulationen der Diversität von MTs gehören der Einbau von alternativen Tubulin-Isoformen und posttranslationale Modifikationen (PTM) der Tubulin-Untereinheiten (Janke und Kneussel, 2010; Ludueña, 1998; Wilson und Borisy, 1997). Die posttranslationalen Modifikationen (Abbildung 1-4), sind entscheidend für die Eigenschaften und Funktionen der Mikrotubuli. Die breite Palette von PTMs können allein oder in Kombination chemische Unterschiede erzeugen, die ausreichend sind, um Mikrotubuli spezifische zelluläre Funktionen zu verleihen (Janke und Kneussel, 2010; Verhey und Gaertig, 2007; Westermann und Weber, 2003).



**Abbildung 1-4:** Schematische Darstellung des α-/β-Tubulin Dimers mit den dazugehörigen Modifikationen. Sowohl α- als auch β-Tubulin können an verschiedenen Glutamat-Resten polyglycyliert und polyglutamyliert werden. Zusammen mit der Detyrosinierung am C-Terminus und dem anschließenden entfernen des vorletzten Glutamatrestes, welches die Δ2-Tubulin generiert, sind diese Modifikationen spezifisch für den C-Terminus. Die Acetylierung dagegen findet ausschließlich innerhalb des Tubulin-Dimers statt (modifiziert nach (Janke and Chloë Bulinski, 2011)).

Die reversible Detyrosinierung/Retyrosinierung von α-Tubulin wurde bereits 1973 beschrieben und ist die am besten charakterisierte Tubulin-Modifikation (Barra, Rodriguez und Arce, 1973). Durch Detyrosinierung wird das C-terminale Tyrosin mittels einer noch nicht bekannten Carboxypeptidase entfernt (Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, 1977). Detyrosiniertes Tubulin wird üblicherweise mit MT-Stabilität in Verbindung gebracht, da langlebige MTs in vielen Zelltypen detyrosiniert vorliegen (Schulze, Asai und Bulinski,

---

1987). Trotz allem ist diese Modifikation nicht *per se* für die Stabilität von Mikrotubuli verantwortlich. Detyrosiniertes Tubulin kann zusätzlich zu  $\Delta 2$ -Tubulin konvertiert werden, indem irreversibel das vorletzte Glutamat abgespalten wird (Paturle, Wehland und Margolis, 1989). Diese Reaktion wird durch eine Deglutamylase der CCP-Familie (zytosolische Carboxypeptidasen) katalysiert (Rogowski et al., 2010). In Neuronen beispielsweise, ist die  $\Delta 2$ -Tubulin-Modifikation auf sehr stabile MTs beschränkt, welche in der letzten Phase der funktionellen Differenzierung auftreten und Mikrotubuli an dem Polymerisations/Depolymerisationszyklus hindern (Paturle-Lafanechère et al., 1994). Zudem könnte diese Modifikation MTs in einem detyrosiniertem Status blockieren und somit zu einer permanenten Stabilisierung führen (Janke und Chloë Bulinski, 2011). Es wurde gezeigt, dass MCAK und auch neuronales KIF2A bevorzugt tyrosiniertes Tubulin depolymerisieren (Khawaja, Gundersen, 1988; Peris et al., 2009).

Die Acetylierung des Lysins 40 innerhalb des Tubulin-Polymers wurde als zweite Tubulin-Modifikation entdeckt (L'Hernault und Rosenbaum, 1985; Maruta et al., 1986). Bis heute wurden weitere Acetylierungsstellen in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin entdeckt (Choudhary et al., 2009). Gegenwärtig sind zwei Tubulin-Deacetylasen bekannt: Histondeacetylase 6 (HDAC6) und Sirtuin 2 (SIRT2). Beide sind Homologe der HDACs und deacetylieren bevorzugt  $\alpha$ -Tubulin und andere zytoplasmatische Substrate eher als Histone selbst. HDAC6 selbst zeigt dabei keine Deacetylierungsaktivität bei Histonen (Janke und Chloë Bulinski, 2011). Die Acetyltransferasen ARD-NAT1 (*arrest defectiv 1 amino-terminal,  $\alpha$ -amino acetyltransferase 1*) und ELP-Komplex (*elongator protein complex*) haben zwar einen Effekt auf die Acetylierung von Lysin 40, aber Mec-17 (*mechanosensory abnormality 17*) und seine Orthologen wurden als die wesentlichen Acetyltransferasen für Lysin 40 in  $\alpha$ -Tubulin beschrieben (Akella et al., 2010; Ohkawa et al., 2008; Shida et al., 2010; Solinger et al., 2010). Mec-17 wurde daraufhin in Tubulin-N-Acetyltransferase 1 ( $\alpha$ -TAT) umbenannt. Das Expressionslevel von  $\alpha$ -TAT korreliert mit der Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin, aber nicht anders herum, da manche Organismen zwar das Lysin 40 innerhalb des  $\alpha$ -Tubulin besitzen aber kein  $\alpha$ -TAT oder eines seiner Homologen (Janke und Chloë Bulinski, 2011).

Die Analyse von Säugetiergehirn mittels Massenspektrometrie zeigte, dass Tubulin polyglutamyliert ist. Dabei werden die hydrophoben Glutamat-Reste an die  $\gamma$ -Carboxygruppe eines oder mehrere Glutamin-Reste nahe des C-Terminus addiert (Alexander et al., 1991; Eddé et al., 1990). Neben der Polyglutamylierung wurde als zusätzliche Modifikation die Polyglycylierung beschrieben, bei welcher neutrale Glycinketten an Glutamat-Reste addiert werden (Redeker et al., 1994). Beide Modifikationen sind heterogener als die anderen bekannten Tubulin-Modifikationen und sind sowohl an  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zu finden (Janke



---

und Chloë Bulinski, 2011). Die Polyglutamylierung wird durch einen Multiproteinkomplex mit TTLL-like1 (Tubulin-Tyrosin Ligase-like Protein 1) als katalytische Untereinheit katalysiert (Janke et al., 2005). Diese TTLL-Enzym Familie enthält sowohl Glutamylierungs- als auch Glycylierungsenzyme (Ikegami und Setou, 2009; Rogowski et al., 2009; Wloga et al., 2009). Jedes dieser TTLL-Enzyme weist bestimmte Reaktions-Präferenzen auf, welche entweder an  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin lange oder kurze Seitenketten generieren (van Dijk et al., 2007; Rogowski et al., 2010). Für die Deglutamylierung wurden die Enzyme der CCP-Familie identifiziert (Kimura et al., 2010; Rogowski et al., 2010). Diese Deglutamylasen entfernen entweder die Verzweigungen der Glutamat-Seitenketten oder hydrolysieren Peptidbindungen zwischen den Glutamat-Resten der linearen Kette, wodurch wiederum  $\Delta 2$ -Tubulin entsteht (Janke und Chloë Bulinski, 2011).

---

#### 1.4.1 Mikrotubuli und Krebs

---

In einer Vielzahl von Krebsarten gibt es Veränderungen des Mikrotubuli-Netzwerkes, wie die Expression der verschiedenen Tubulin-Isotypen, veränderte postranslationale Modifikationen und veränderte Expression von MAPs (Parker et al., 2014). Variationen in der Tubulin-Isotypen-Expression sind die am besten charakterisierten Veränderungen in Krebs und konnten in soliden sowie in hämatologischen Tumoren beobachtet werden. Dies führt oft zu einer Chemotherapie-Resistenz und einer schlechteren Prognose der Patienten. So sind beispielsweise Veränderungen in der Expression von  $\beta$ III-Tubulin mit schlechter Prognose, Resistenz gegen Tubulin-Bindungs-Agenzien (TBAs) und andere Chemotherapeutika verbunden (Kavallaris, 2010). Zu bemerken ist, dass die zelluläre Homöostase sich auf dynamische MTs stützt und durch Veränderung der Stabilität und Dynamik von MTs gestört werden kann (Parker et al., 2014). Dabei beeinflusst die Tubulin-Isotypen-Zusammensetzung nicht die Stabilität der MTs und somit nicht die Empfindlichkeit von TBAs (Bhattacharya, 2004; Schwarz et al., 1998), sondern speziell die MT Dynamik. Dies wurde in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) gezeigt, in dem  $\beta$ III-Tubulin depletiert wurde und somit die MT Dynamik in Anwesenheit von TBAs erhöht war (Gan et al., 2010).

Die Tyrosinierung von  $\alpha$ -Tubulin ist für die Differenzierung, den Transport von Organellen und den Zellzyklus ein kritischer Faktor (Janke und Chloë Bulinski, 2011). Ein verändertes Level an dieser Modifikation und den dazugehörigen Enzymen wurde in einer Reihe von

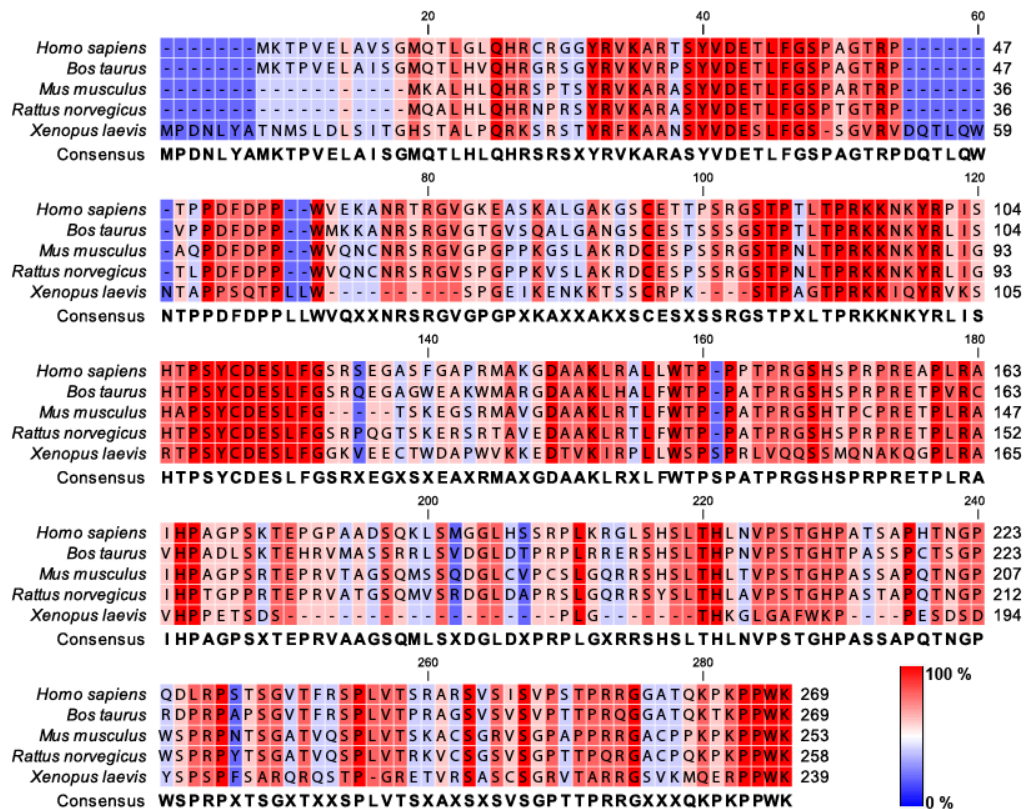
---

Krebsarten gefunden und ist mit einer erhöhten Aggressivität verbunden (Soucek et al., 2006). Der Verlust von TTL (*tubulin tyrosin ligase*) induziert einen mesenchymalen Übergang in Brustkrebszellen, und dies führt zu einem erhöhten Metastasierungspotential und veränderter Stressreaktion der Zelle (Whipple et al., 2010).

Eine erhöhte  $\alpha$ -Tubulin-Acetylierung an Lysin 40 wurde auch in Tumorzellen beobachtet (Giustiniani et al., 2009). Die erhöhte Expression von HDAC6, die die Acetylierung reguliert, ist mit einer besseren Prognose bei Brustkrebs assoziiert (Zhang et al., 2004). Diese Modifikation von  $\alpha$ -Tubulin hat Einfluss auf den intrazellulären Transport und die MT-Dynamik (Friedman et al., 2010; Gao et al., 2010). Die Wechselwirkung von Tubulin mit den MAPs beeinflusst die Stabilität und die Dynamik. Zudem haben diese einen Effekt auf die Wirksamkeit von Chemotherapeutika und das Tumorwachstum (Bhat and Setaluri, 2007). Zum Beispiel korreliert die Überexpression von Tau mit einer schlechteren Prognose bei Brustkrebs und beeinflusst die Affinität von Taxanen mit  $\beta$ III-Tubulin negativ (Rouzier et al., 2005). Auch Veränderungen in der Expression von Stathmin, BRAC1 (*Breast cancer type 1 protein*), CLIP-170 (*cytoplasmic linker protein CLIP-170*) und VHL (*Von Hippel-Lindau disease tumor suppressor*) sind mit einer Chemotherapie-Resistenz assoziiert (Bhat und Setaluri, 2007; Sun et al., 2012). Auch Kinesine interagieren unterschiedlich mit den Tubulin-Isotypen und deren Modifikationen (Sirajuddin et al., 2014). Somit können Veränderungen an den MTs die Funktion von Motorproteinen stark beeinflussen (Parker et al., 2014).

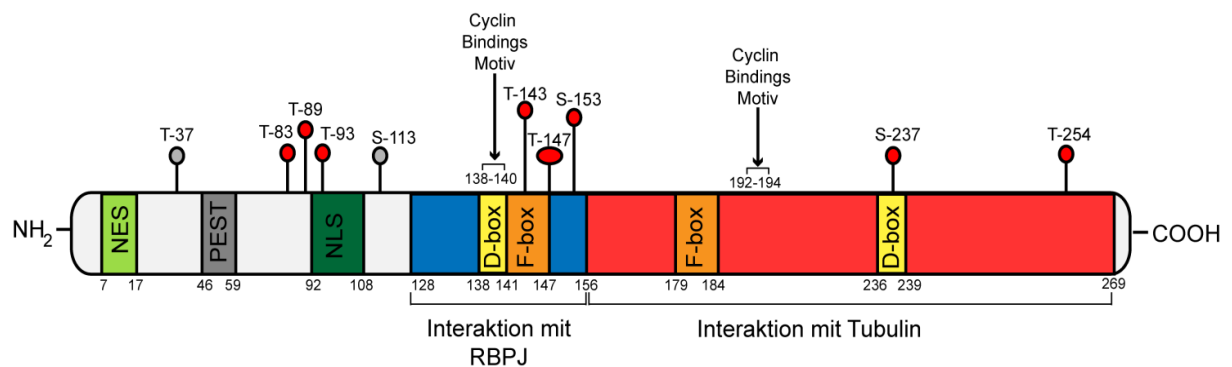
## 1.5 RITA (RBP-J interacting and tubulin associated)

RITA, das RBP-J interagierende und Tubulin-assoziierte Protein, wurde in einem *Yeast Two Hybrid screen* als neuer Interaktionspartner für RBP-J (*Recombining binding protein suppressor of hairless*) identifiziert (Wacker et al., 2011). RBP-J bindet DNA und spielt eine wichtige Rolle im Notch-Signalweg (Tamura et al., 1995). RITA stört durch die Erleichterung des Kernexportes von RBP-J in das Zytoplasma, die durch Notch vermittelte Transkription (Wacker et al., 2011). In *Xenopus laevis* wirkt RITA der Transkriptionsaktivierung von Notch-Zielgenen entgegen. Daraus resultiert der Verlust der primären Neurogenese, die durch dominant aktives Notch-1 induziert wird (Wacker et al., 2011). Somit wurde RITA als negativer Modulator eines aktivierten Notch-Signalweges durch die Regulation des Exportes von RBP-J in das Zytoplasma beschrieben. RITA ist ein 36 kDa großes Protein, das keine signifikanten Homologien zu anderen Proteinen besitzt und höchst konserviert in verschiedenen Spezies vorliegt (Abbildung 1-5).



**Abbildung 1-5:** RITA ist ein evolutionär konserviertes Protein. Die Konservierung der Aminosäuren ist durch einen Farbcode dargestellt (modifiziert nach Wacker et al., 2011).

RITA besitzt eine Tubulin-Bindungsdomäne, ein funktionelles Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS), ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) und eine RBP-J-Bindungsdomäne (Abbildung 1-6).



**Abbildung 1-6:** Schematische Darstellung der Domänen innerhalb RITA. NES Kern-Exportsignal, NLS Kernlokalisierungssignal, RBP -Bindungsdomäne, Tubulin-Bindungsdomäne und potentielle Phosphorylierungsstellen (modifiziert nach Wacker et. al., 2011).

Die Regulation der subzellulären Lokalisierung von RBP-J durch RITA könnte durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung von RITA abhängig sein. Neben der Tubulin-Interaktionsdomäne und der NLS, wurden zwei hochkonservierte W-X-P Motive (RCR1 und RCR2) ausschließlich in RITA identifiziert. RCR1 und RCR2 weisen das Konsensus-Motiv S-Y-X-D-E-(S/T)-L-F-G auf, welches für spezifische Protein-Protein-Interaktionen oder als Zielstellen für posttranslationale Modifikationen dienen könnte. RITA wird phosphoryliert, und eine Datenbanksuche nach mutmaßlichen Kinasen ergab mehrere Phosphorylierungsmotive für verschiedene Serin/Threonin-Kinasen (Wacker et al., 2011).

---

## 1.6 Zielsetzung der vorliegenden Dissertation

---

Neben der Rolle von RITA in der Regulation des Exports des Transkriptionsfaktors RBPJ, welcher eine Rolle im Notch-Signalweg spielt (Wacker et al., 2011), ist die Funktion von RITA an den Mikrotubuli gänzlich unbekannt. Auch die Regulation während des Zellzyklus in Krebszellen wurde bisher nicht untersucht. Durch die Lokalisation an den Mikrotubuli, kann RITA als ein potentielles MAP fungieren. Daher ist eine ausführliche Untersuchung der physiologischen Funktion von RITA und seiner molekularen Regulation in der Mitose im Zusammenhang mit der MT-Dynamik, welche eine zentrale Rolle in der Mitose spielt, in Krebszellen wichtig. In der vorliegenden Dissertation werden die folgenden Aspekte näher untersucht:

1. Untersuchung der physiologischen Rolle von RITA während der Mitose
2. Einfluss der Depletion von RITA auf die Zellzyklusprogression
3. Untersuchung der genauen Lokalisation von RITA an Mikrotubuli
4. Untersuchung des Einflusses von RITA auf die MT-Dynamik
5. Untersuchung potentieller Bindungspartner

Die genaue zeitliche und fehlerfreie Regulation des Zellzyklus und der damit einhergehenden MT-Dynamik sind essentiell wichtig, um chromosomale Stabilität zu gewährleisten. Die vorliegende Dissertation wird grundlegend dazu beitragen, die Funktionen von RITA als potentiell MAP zu vervollständigen.

---

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Verwendete Materialien und Geräte

---

#### 2.1.1 Chemikalien

---

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs; CH) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in der Qualitätsstufe p.a. bezogen.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

---

Alle Verbrauchsmaterialien, falls nicht anders angegeben, wurden von den Firmen BD Biosciences (Heidelberg), Corning Incorporated Costar (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One (Frickenhäusen), Nunc (Langenselbold), Sarstedt (Nümbrecht), Thermo Fisher Scientific (Darmstadt) oder Starlab (Ahrensburg) bezogen.

#### 2.1.3 Laborgeräte

---

<i>Blotting</i> -Apparatur X Cell II	(Invitrogen, Karlsruhe)
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	(Bio-Rad, München)
Brutschrank BBD 6220	(Heraeus, Hanau)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell Systems	(Bio-Rad, München)
XCell SureLock® Mini-Cell	(Invitrogen, Karlsruhe)
Entwicklermaschine Optimax Typ TR	(MS Laborgeräte, Wiesloch)
FACScan, FACSCalibur	(BD Biosciences, Heidelberg)
Geltrockner Model 583 Gel Dryer	(Bio-Rad, München)
Gene Pulser® II	(Bio-Rad, München)
Inkubations-Schüttelschrank	(Braun, Melsungen)
Luminometer Victor 1420 Multilabel Counter	(Wallac, Finnland)
Mikroskop IDO3	(Zeiss, Jena)
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager 7.1	(Zeiss, Göttingen)

---

Konfokal Mikroskop CTR 6500 (CLSM)	(Leica, Heidelberg)
pH-Meter Fisherbrand Hydrus 400	(Fisher Scientific, Schwerte)
Pipetten	(Eppendorf, Hamburg)
Pipettierhilfe Express Falcon	(Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Rotator	(Fisher-Scientific, Nidderau)
Spektrophotometer Ultrospec 3100 pro	(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
StepOne <i>Real-Time</i> PCR System	(Applied Biosystems, Darmstadt)
Sterilbank HB2448	(Heraeus, Hanau)
SAFE 2020	(Thermo Fisher)
Sterilbank Lamin Air® HA 2448 GS	(Heraeus, Hanau)
Thermo-Cycler 2720	(Applied Biosystems, Darmstadt)
<i>Time-lapse</i> CellObserver System	(Zeiss, Hallbergmoos)
Zellzählkammer Neubauer	(Renner, Darmstadt)
Zentrifuge 5415R	(Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge Biofuge fresco	(Heraeus, Hanau)
Zentrifuge Minifuge GL	(Heraeus, Hanau)
Zentrifuge Sorvall RC-5B	(Du Pont, Markham)

---

#### 2.1.4 Software

---

AxioVision 4.8	(Zeiss, Heidelberg)
CLC free Workbench	(CLC bio, Dänemark)
LAS AF software	(Leica, Heidelberg)
CellQuest	(BD Biosciences, Heidelberg)
Image J	(National Institutes of Health, USA)
StepOne v2.1	(Applied Biosystems, Darmstadt)

---

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

---

Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser und mit Tris-Base angesetzt. Wenn benötigt wurden Lösungen und Puffer 20 min lang bei 121 °C und 2,0 bar autoklaviert oder steril filtriert. Der pH-Wert wurde sofern nicht anders mit 1 M NaOH oder 1 M HCl eingestellt.

### **ABD Puffer (Blocking)**

10 mM Tris, pH 7,5

0,9 % NaCl

5 mM EDTA

1 mg/ml BSA

10 % FCS (immer frisch dazu geben)

### **Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)**

1 g Ampicillin

ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.

Anwendung im Verhältnis 1:1.000 für LB-Medium und LB-Agar

### **Bakterien-Lyse-Puffer**

250 mM Natriumchlorid

50 mM Tris, pH 8,0

10 % Glycerol

1 % Triton-X-100

### **Coomassie-Färbelösung**

40 % Methanol (v/v)

10 % Essigsäure (v/v)

0,125 % Coomassie Brilliantblau R 250 (w/v)

### **DTT-Stammlösung**

1 M DTT in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 5,2 (10 mM Natriumazid)



---

### **ECL Lösung A**

200 ml            0,1 M Tris, pH 8,6

50 mg Luminol

### **ECL Lösung B**

11 mg para-Hydroxycumarinsäure

10 ml            Dimethylsulfoxid (DMSO)

### **Immunfluoreszenz *Blocking*-Puffer**

10 mM           Tris, pH 7,5

0,9 %           Natriumchlorid

5 mM            EDTA

1 mg/ml        BSA

10 %            FCS

### **Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml)**

0,5 g            Kanamycin

ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.

### **Laufpuffer für Tris/Glycin-Gele**

1,4 %           Glycin (w/v)

0,3 %           Tris (w/v)

0,2 %           SDS (w/v)

### **MSKAT-Puffer**

4 mM            Magnesiumchlorid

2 M              Natriumacetat

33 mM          Kaliumchlorid

20 mM          Ammoniumsulfat

0,4 M           Tris, pH 8,0

ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest.

---

### MTSB-Puffer

4 mM            Magnesiumchlorid  
2 M             Natriumacetat  
33 mM          Kaliumchlorid  
20 mM          Ammoniumsulfat  
0,4 M          Tris, pH 8,0  
ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest.

### Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-Stammlösung, pH 9,5

100 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O bidest. lösen, pH 9,5 (0,1 M NaOH)

### NP-40 Lysepuffer (IP)

50 mM          Tris, pH 8,0  
150 mM        Natriumchlorid  
1 %            NP-40

### PBST

0,2 % Tween-20 in 1x PBS

### Proteaseinhibitor (50x)

1 Tablette Proteaseinhibitor *Complete* in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest. Lösen

### RIPA-Puffer

150 mM        Natriumchlorid  
50 mM        Tris, pH 8,0  
0,5 %        Na-Desoxycholat (w/v)  
1 %          NP-40 (v/v)  
0,1 %        SDS (w/v)  
1 mM        Natriumfluorid

Zusätze (immer frisch dazugeben):

1 mM        DTT  
100 µM      Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
400 µM      PMSF  
1x Proteaseinhibitor *Complete*

---

### **Schnellentfärber für Coomassie-Gele**

40 %	Ethanol (v/v)
20 %	Essigsäure (v/v)
40 %	H <sub>2</sub> O bidest. (v/v)

### **Sammelgel-Puffer**

1 M Tris, pH 6,8

### **3x SDS-Probenpuffer**

240 mM	Tris, pH 6,8
0,6 %	Bromphenolblau (w/v)
30 %	Glycerol (v/v)
5 %	β-Mercaptoethanol (v/v)
6 %	SDS (w/v)

### **TFB I-Puffer, 4 °C**

30 mM	Kaliumacetat pH 5,8 (mit 2 M Essigsäure einstellen)
50 mM	Manganchlorid
100 mM	Rubidiumchlorid
10 mM	Calciumchlorid
15 %	Glycerol (v/v)

### **TFB II-Puffer, 4 °C**

10 mM	MMOPS, pH 6,5
75 mM	Calciumchlorid
10 mM	Rubidiumchlorid
15 %	Glycerol (v/v)

### **TBST**

10 mM	Tris, pH 7,6
150 mM	Natriumchlorid
0,1 %	Tween-20

---

### **Trenngel-Puffer**

1 M Tris, pH 8,8

### **Western Blot *Blocking*-Puffer**

5 % Magermilchpulver (w/v)

Ad 100 ml PBST

oder

5 % BSA (w/v)

Ad 100 ml PBST

### **Western Blot-Transfer-Puffer**

1,4 % Glycin (w/v)

0,3 % Tris (w/v)

20 % Methanol (v/v)

### **50x TAE-Puffer**

242 g Tris

57,1 ml Essigsäure

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest.

---

## **2.1.6 Bakterienstämme und Enzyme**

---

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Bakterienstämme von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet:

DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup>  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk, mk<sup>+</sup>) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda^-$

BL21: F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *gal dcm* (DE3)

In der nachfolgenden Tabelle sind die während der Arbeit verwendeten Enzyme aufgelistet.

**Tabelle 1:** Auflistung der verwendeten Enzyme.

<b>Name</b>	<b>Klassifizierung</b>	<b>Quelle</b>
BamHI	Restriktionendonuklease	Fermentas (Darmstadt)
Benzonase	Restriktionendonuklease	Merck (Darmstadt)
CIP	Phosphatase	NEB (Schwalbach)
DpnI	Restriktionendonuklease	NEB (Schwalbach)
EcoRI	Restriktionendonuklease	Fermentas (Darmstadt)
FastAP	Phosphatase	Fermentas (Darmstadt)
Lysozym	Hydrolase	Fluka Analytical (Steinheim)
Pfu-Polymerase	DNA-Polymerase	Agilent Technologies (Frankfurt)
T4 Ligase	DNA-Ligase	NEB (Schwalbach)
XhoI	Restriktionendonuklease	Fermentas (Darmstadt)

### 2.1.7 Antikörper

Folgende primären und sekundären Antikörper wurden für Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzstudien eingesetzt.

**Tabelle 2:** Auflistung der verwendeten Antikörper.

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aktin	Maus	Sigma
ACA	Human	ImmunoVision
Aurora B	Kaninchen	Cell Signaling
Aurora A	Kaninchen	Santa Cruz
p-Aurora A (T288)	Kaninchen	Cell Signaling
Cyclin B1	Maus, Kaninchen	Santa Cruz
Flag M2	Maus	Sigma
GAPDH	Kaninchen	Abcam
GFP	Maus	Santa Cruz
Lamin B1	Maus	MBL
Plk1 (F8)	Maus	Santa Cruz
pHH3	Kaninchen	Millipore
PARP	Kaninchen	Cell Signaling
Pericentrin	Maus, Kaninchen	Abcam
hsRITA	Kaninchen	Epitomics
Alpha-Tubulin	Maus	Sigma
Alpha-Tubulin	Kaninchen	Abcam
Alpha-Tubulin	Ratte	Serotec
Alpha-Tubulin acetyl.	Maus	Sigma

Detyro. Alpha-Tubulin	Kaninchen	Abcam
Polyglut. Alpha-	Kaninchen	Adipogen
MCAK	Maus	Santa Cruz
Mec17	Kaninchen	Abcam
HDAC6	Kaninchen	Cell Signaling
TPX2	Kaninchen	LSBio
Maus IgG HRP	Maus	GE Healthcare
Kaninchen IgG HRP	Kaninchen	GE Healthcare
Normal Maus IgG	Maus	Santa Cruz
Normal Kaninchen IgG	Kaninchen	Santa Cruz
Cy3	Maus, Kaninchen, Ratte, Human	ImmunoJackson
Cy5	Maus, Kaninchen, Ratte, Human	ImmunoJackson
FITC	Maus, Kaninchen, Ratte, Human	ImmunoJackson

### 2.1.8 Zelllinien

In der vorliegenden Dissertation wurden folgende Zelllinien verwendet. Die Zelllinien wurden von DSMZ (Braunschweig) bezogen.

**Tabelle 3:** Auflistung der verwendeten Zelllinien.

<b>Zelllinie</b>	<b>Medium</b>
HeLa	MEM-Medium (Sigma) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penstrep (Sigma)
MCF-7	RPMI 1640 (Sigma) + 10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penstrep (Sigma)
HCT116	McCoy's (X) +10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penstrep (Sigma)
U2-OS	McCoy's (X) +10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland) +1% Penstrep (Sigma)
293T	DMEM+10%FCS (PAA, Cölbe, Deutschland)
MEFs	DMEM+10%FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland)+1% Na-Pyrovat+1% NEAA+1%GlutaMax

### 2.1.9 siRNA

Die siRNA gegen RITA und MCAK wurden von Sigma-Aldrich hergestellt und bezogen. Die Kontroll siRNA wurde von Qiagen (Hilden) bezogen.

**Tabelle 4:** Auflistung der verwendeten siRNAs.

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Quelle</b>
siRITA 1	GGA AGA AGA ACA AAU ACA G	Sigma
siRITA 2	AGG GAA CCC CAG GUA UUA AUU	Sigma

---

## 2.2 Molekularbiologische Arbeiten

---

---

### 2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

---

Bei der Behandlung von Bakterienzellen mit Rubidiumchlorid nehmen die abstoßende Kräfte zwischen der negativ geladenen Zellmembran und der negativ geladenen DNA ab und die Bakterienzelle kann Fremd-DNA besser aufnehmen (Hanahan, 1983). Hierzu wurden kompetente *E. coli* Bakterien für eine Vorkultur in 5 mL SOB Medium überimpft und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Vorkultur wurde in 200 mL MgCl<sub>2</sub> SOB Medium überführt und bei 37 °C inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht war. Nach Abkühlen für 10 min auf Eis wurden die Zellen 5 min bei 5000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 30 mL kaltem TFB I Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 5000 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml kaltem TFB II Puffer resuspendiert und in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 200 µL aliquotiert. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgt nach dem Schockgefrieren im flüssigen Stickstoff bei -80 °C.

---

### 2.2.2 Transformation von Plasmid-DNA

---

Transformation ist die nicht-virale Übertragung freier Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Dabei dient ein Antibiotikaresistenzgen auf der Plasmid-DNA als Selektionsmarker (Hanahan, 1983).

Hierzu wurden zu 200 µL kompetenten Bakterien die zu transformierenden DNA (5 µL eines 20 µL Ligationsansatzes oder 1 ng Plasmid DNA ) gegeben, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 5 min bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde kurz auf Eis abgekühlt und anschließend in 800 µL LB-Medium für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert und in 100 µL LB-Medium resuspendiert, auf selektiv LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.



---

### 2.2.3 DNA-Isolierung

---

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einer 6 mL Übernachtskultur wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei Isolierung größerer DNA Mengen wurde (50 mL Übernachtskultur) das PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt Auskunft über die Reinheit und sollte bei reiner DNA bei 1,8 liegen.

---

### 2.2.4 Klonierung und Punkt-Mutagenese

---

Die Klonierung der folgenden RITA-Konstrukte wurde bereits beschrieben (Wacker et al., 2011). In der nachstehenden Tabelle sind alle verwendeten Plasmid-Konstrukte aufgelistet.

**Tabelle 5:** Verwendete DNA-Konstrukte.

Konstrukt	Resistenz	Quelle
pcDNA3-Flag1_hsRITA_(1-269) (wt)	Ampicilin	(Wacker et al., 2011)
pcDNA3-GFP-hsRITA_1-269 (wt)	Ampicilin	(Wacker et al., 2011)
pGEX6P1 RITA_1-269 (wt)	Ampicilin	(Wacker et al., 2011)
pcDNA3-Flag1_hsRITA_1-258( $\Delta$ tub)	Ampicilin	(Wacker et al., 2011)
pcDNA3-GFP-hsRITA_1-258 ( $\Delta$ tub)	Ampicilin	(Wacker et al., 2011)
pGEX6P1 RITA_1-258 ( $\Delta$ tub)	Ampicilin	(Wacker et al., 2011)

Zur Erstellung von RITA-Punktmutanten *in vitro* wurden spezifischen *Primern* bei der Firma Sigma Aldrich konstruiert, welche die gewünschte Mutation trugen. Dazu wurden in einer PCR mit den Wildtyp-Konstrukten die Punktmutation mittels der spezifischen *Primern* eingeführt. Die PCR-Ansätze wurden anschließend für 1 h bei 37 °C mit 20 U *Dpn* I (NEB, Schwalbach) behandelt. Die Endonuklease *Dpn* I schneidet spezifisch maternale methylierte oder hemimethylierte DNA. Daraufhin wurde die DNA in kompetente Bakterien eingebracht und auf selektive Agar-Platten ausgestrichen. Drei bis vier der gewachsenen Klone wurden zur DNA Isolierung angeimpft. Zur Überprüfung der gewonnenen DNA wurde diese von der Firma SRD (Bad Homburg) sequenziert.

---

## 2.2.5 Expression von Proteine in Bakterien

---

Für *in vitro* Kinase Assay, *Pulldown Assay* und *in vitro* Depolymerisations Assay wurden bakteriell exprimierte Proteine verwendet. Hierzu wurden 5 ml einer Übernachtsbakterienkultur in 95 ml selektiv LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,6 bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, AppliChem, Darmstadt) induziert und die Kultur weitere 2 h im Schüttelschrank inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (Zentrifuge Sorvall RC-5B, Rotor GSA: 5.000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 2 ml *Cell-Lytic*-Puffer (Sigma Aldrich), (Benzoenase, Lysozym, 1 mM DTT, 100 μM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 400 μM PMSF, 1x Proteaseinhibitor *Complete*) resuspendiert. Anschließend wurde das Zellpellet für 15min bei Raumtemperatur rotiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4 °C, wurde der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30 μl zuvor gewaschenen Glutathion Sepharose™ 4B *beads* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) versetzt. Über Nacht bei 4 °C erfolgte die Kopplungsreaktion auf einem Rotator. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert (Minifuge GL: 2.000 rpm, 3 min, 4 °C). Es folgten drei Waschschrte der *beads* mit PBS. Zur Gewinnung der GST-Fusionsproteine wurden die *beads* mit 60 μl Elutionspuffer versetzt und 2 h bei 4 °C auf dem Rotator eluiert. Nach Zentrifugation wurden die GST-Fusionsproteine mit 20 % Glycerol zur Stabilisierung versetzt und bei -80 °C gelagert.

---

## 2.3 Zellbiologische Arbeitsmethoden

---

---

### 2.3.1 Allgemeine Zellkulturarbeiten

---

Die Zellen wurden in dem entsprechenden Medium (Tabelle 3) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Kultivierung von stabilen Zelllinien wurde das Medium zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks zusätzlich mit dem Antibiotikum G418 (Geneticinsulfat; 1.500 µg/ml) oder Puromycin (5 µg/ml) versetzt. Die adhärenenten Säugerzellen wurden für das Passagieren mit 0,05%iger Trypsin-/EDTA-haltiger Lösung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> behandelt. Für das Einfrieren von Zellen wurde Medium bestehend aus 40 % des betreffenden Kulturmediums, 50 % FCS und 10 % DMSO in Kryo-Röhrchen verwendet. Anschließend wurden die Zellen bei einer Temperatur von -80 °C über Nacht in einer Kryobox eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

---

### 2.3.2 Synchronisation der Zellen und Inhibitor Behandlungen

---

Zur genaueren Untersuchung der Zellzyklusphasen wurden die Zellen synchronisiert. Um Zellen in die G1/S-Phase zu synchronisieren, wurde ein doppelter Thymidin-Block durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in einem ersten Inkubationsschritt mit 0,5 mg/ml (2 mM) Thymidin (Sigma-Aldrich, Steinheim) für 16 h bis 20 h behandelt. Anschließend wurde der Zellzyklus-Block für 8-10 h durch Waschen mit PBS und Zugabe von frischem Medium gestoppt und anschließend ein zweiter Inkubationsschritt mit Thymidin für 16 h wiederholt. Zur Synchronisation der Zellen in die Prometaphase wurden diese mit 20 bis 50 ng/ml Nocodazol (Sigma-Aldrich, Steinheim) für 12 bis 16 h inkubiert. Nocodazol verhindert die Polymerisation der Mikrotubuli und führt zu einem Prometaphase Arrest (Vasquez et al., 1997). Zur Durchführung einer Kinetik nach Nocodazol-Freilassung (*release* oder *shake-off* Experiment) wurden die Zellen für 14 h mit 20 ng/ml Nocodazol inkubiert. Synchronisierten Zellen wurden durch Schütteln von dem Boden der Zellkulturschale gelöst, in ein 50 ml Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifuge Rotanta/RPC: 1.300 rpm, 5 min, RT). Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und wieder eingesät. Die Synchronisation der Zellen in die G2-Phase erfolgte durch Zugabe von 9 µM des Cdk1-Inhibitors RO-3306 (Merck, Darmstadt) für 20 h (Vassilev

---

et al., 2006). Für Experiment mit dem spezifischen Aurora A Inhibitor MLN8054 (Selleckchem, München, wurden die Zellen mit 15 nM über Nacht behandelt.

---

### **2.3.3 Proteinstabilität**

---

Zur Messung der Proteinstabilität wurde der Proteinsyntheseinhibitors Cycloheximid (CHX) (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. CHX blockiert die Elongationsphase der eukaryotischen Translation, bindet an das Ribosom und hemmt somit die eEF2-vermittelte Translokation (Schneider-Poetsch et al., 2010). Dazu wurden Zellen nach einem *release* bzw. *shake-off* nach Nocodazol Behandlung in Medium mit 10 µg/ml CHX gegeben oder Zellen für eine bestimmte Zeit mit 10 µg/ml CHX behandelt und nach bestimmten Zeitpunkten geerntet.

---

### **2.3.4 Transfektion von Plasmid-DNA**

---

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryontische Zellen. Für die transiente Transfektion von Plasmid-DNA wurde jeweils nach Herstellerangaben mit FuGENE®-6 HD im Verhältnis 1:3 oder im Verhältnis 1:2 verwendet. Dafür wurden die Zellen jeweils am Vortag ausgesät und hatten am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 bis 80 %. Die Transfektion wurde nach 5 h durch Zugabe von Medium abgestoppt und die Zellen für weiter 24 h bis 48 h kultiviert.

---

### **2.3.5 Transfektion von siRNA**

---

Zur Transfektion von siRNA mittels Oligofectamine™ wurden die Zellen am Vortag so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-60 % besaßen. Es wurden die Ansätze A und B pipettiert (Tabelle 6) und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Ansatz B zu Ansatz A gegeben und für 20 min inkubiert (RT). Die Zellen wurden mit der entsprechenden Menge OPTI-MEM I (Vorlage) überschichtet und der Transfektionsmix tropfenweise dazugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C sowie 5 % CO<sub>2</sub> für 5h. Nach 5 wurde der Transfektionsmix vollständig abgenommen und durch Kulturmedium mit 10 % FCS ersetzt.

**Tabelle 6:** Ansätze zur Transfektion von siRNA in verschiedene Zellkulturschal-Größen.

<b>Ansatz A</b>	<b>6-well</b>	<b>6 cm Schale</b>	<b>10 cm Schale</b>
OPTI-MEM I	400	650	2000
siRNA (20 µM)	0,4	0,65	2
<b>Ansatz B</b>	<b>6-well</b>	<b>6 cm Schale</b>	<b>10 cm Schale</b>
OPTI-MEM I	100	162,5	500
Oligofectamin	3	4,875	15
<b>Vorlage</b>	<b>6-well</b>	<b>6 cm Schale</b>	<b>10 cm Schale</b>
OPTI-MEM I	296,6	482	1483

### 2.3.6 *Time-lapse* Mikroskopie

Zur Echtzeit-Analyse von Zellen wurde die Methode der *Time-lapse* Videomikroskopie in Kooperation mit Dr. rer. nat. Michael Rieger (Georg-Speyer- Haus, Frankfurt) durchgeführt. Hierzu wurden stabil mit H2B-*Tomato* transfizierte HeLa Zellen verwendet, bei denen sich der DNA-Gehalt und der Kondensationszustand der DNA genau verfolgen ließen. Für siRNA-Experimente wurden die HeLa *Tomato*-Zellen transient in 10 cm Zellkulturschalen mit der jeweiligen siRNA transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in ein 24-*well* Format ausgesät und 16 h bei 37 °C sowie 5 % CO<sub>2</sub> zur CO<sub>2</sub>-Sättigung kultiviert und anschließend gasdicht, mit Klebeband (Beiersdorf, Hamburg) versiegelt.

Die *Time-lapse* Videomikroskopie wurde mittels eines CellObserver System (Zeiss, Hallbergmoos) bei 37 °C durchgeführt. Die Phasenkontrastbilder wurden alle 4 min unter Verwendung eines zehnfach Phasenkontrastobjektives (Zeiss), einer AxioCamHRm Kamera mit einer Auflösung von 1.388x1.040 Pixel und der Zeiss AxioVision 4.8. *Software* aufgenommen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit HXP-Lampen. Die Expression von *Tomato* (Zeiss Filter Set 43HE, 50 ms) wurde ebenfalls alle 4 min detektiert. Es wurden je *well* drei bis sechs Regionen ausgewählt und bis zu 72 h alle 4 min aufgenommen. Die Filme wurden mit der QuickTime 7 Pro Software erstellt.

---

### 2.3.7 MT-assay

---

Polymerisiertes  $\alpha$ -Tubulin wurde wie in Sanhaji et al. (2014) beschrieben gemessen. Dazu wurden HeLa und U2OS-Zellen mit siRNA gegen RITA behandelt. 24 Stunden später wurden die Zellen mit Nocodazol für 14 h synchronisiert und anschließend die mitotischen Zellen mittels *shake-off* gesammelt. Die mitotischen Zellen wurden für 1 h in frischem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte eine Extraktion, Fixierung und Färbung mit  $\alpha$ -Tubulin und Analyse mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (Becton Dickinson, Heidelberg). Dazu wurde das zellulär lösliche  $\alpha$ -Tubulin in einem mit Saponin versetzten MT stabilisierenden Puffer (0,1% Saponin, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 M PIPES, pH 7,4 und 25 nM Taxol) extrahiert. Die resuspendierten Zellen wurden dann mit einem gleichen Volumenanteil von 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 37 ° C für 15 min fixiert. Die Zellen wurden dann gewaschen und mit  $\alpha$ -Tubulin für 1 h gefärbt. Als Zweitantikörper wurde ein FITC-konjugierter anti-Maus-Antikörper (Dako, Hamburg) verwendet. Es wurden zwischen 30.000 und 50.000 Zellen gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde mit der Cell Quest-Software (Becton Dickinson) quantifiziert. Der Polymergehalt in den Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurde als 100% gesetzt.

---

### 2.3.8 Tubulin *regrowth* assay

---

Tubulin *regrowth* assay wurde durchgeführt wie beschrieben in (Lüders et al., 2006). Dazu wurden HeLa- Zellen mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen RITA behandelt. 24 h danach wurden die Zellen in *slide flask* umgestetzt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen 1 h auf Eis inkubiert, damit alle MTs depolymerisieren. Für das Polymerisieren der MTs wurden die Zellen mit warmem Medium bei 37 ° C für 0, 2 und 4 min inkubiert, gefolgt von Methanol Fixierung. Anschließend erfolgte die Färbung von  $\alpha$ -Tubulin, Pericentrin und DNA. Die Intensität von  $\alpha$ -Tubulin wurde mit einem 4,1  $\mu$ m im Durchmesser großen Kreis, rund um die Zentrosomen, analysiert.

---

## 2.4 Proteinchemische Arbeitsmethoden

---

---

### 2.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

---

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurde der Überstand der Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend die adhärenen Zellen mit einem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen wurden in 2 ml kaltem PBS aufgenommen und ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation der Zellen (Zentrifuge Minifuge GL: 1.400 rpm, 10 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 3.000 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert (Zentrifuge 5415R). Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet im ca. gleichen Volumen RIPA-Puffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis und anschließend wurden die Lysate zentrifugiert (Zentrifuge 5415R: 13.000 rpm, 15 min, 4 °C) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Dazu wurden pro Messung 800 µl H<sub>2</sub>O bidest. mit 200 µl Roti-Quant-Lösung (Roth, Karlsruhe) und 1 µl des Proteinlysats in einer Küvette gemischt. Als Leerwert dienten mit 800 µl H<sub>2</sub>O bidest. und 200 µl Roti-Quant-Lösung mit 1 µl Lysepuffer. Aufgrund einer empirisch ermittelten Kalibrierungsgeraden entsprach ein Absorptionswert von OD<sub>595</sub> = 1,0 einer Proteinkonzentration von 21,4 µg/µl. Die Proteinlysate wurden entweder in weiteren Versuchen eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Zur Auftrennung der Zellen in Zytoplasma- und Kernfraktion wurden die Zellen gemäß *Nuclear Complex Co-IP Kit* (Active Motif, Rixensart, Belgien) geerntet und nach Herstellerangaben mit den speziellen Puffern lysiert.

---

### 2.4.2 SDS Gelelektrophorese und Western-Blot

---

Unter denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese lassen sich Proteine nach ihrer Größe auftrennen. Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat zerstören zum Teil die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen, indem sie nichtkovalente Bindungen unterbrechen. Dabei lagern sich ca. 1,4 Gramm SDS pro Gramm Protein an. Das Protein wird somit durch die anionischen Sulfatgruppen negativ geladen. Für die Elektrophorese wurde eine bestimmte Menge Proteinlysats (5 bis 50 µg) mit 3x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die denaturierten Proben wurden über ein SDS-Gel (10 oder 12 %) bei 120 bis 180 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Protein-Marker *PageRuler™*

---

*Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher, Schwerte) verwendet. Für den Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen auf Polyvinylidenfluorid-Membranen bedient man sich der Methode des Western Blots, wobei die Proteine anschließend durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden können. Verwendet wurde hierzu die Immobilon-P Transfer-Membran (Roth, Karlsruhe) mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die Membran wurde gemäß Herstellerangaben vorbereitet. Die Proteine wurden bei konstanter Spannung von 25 V für 30 min in einem Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad, München) von dem Gel auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran mindestens 30 min in *Blocking*-Puffer inkubiert. Nach dem *Blocking* wurde die Membran mit dem primären Antikörper, der in der gewünschten Konzentration in *Blocking*-Puffer verdünnt wurde, inkubiert. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C. Nach der Antikörper-Inkubation erfolgte das Waschen der Membran in PBST (3x 10 min). Danach wurde diese mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörper für 30 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen für 10 min mit PBST wurde die Membran mit Chemilumineszenz-Lösung (Pierce oder Millipore) für 2 min inkubiert. Die Signale wurden mit einem Röntgenfilm Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) detektiert.

---

### 2.4.3 Co-Immunopräzipitation

---

Zur Untersuchung möglicher Protein-Protein-Interaktionen, wurden Co-Immunpräzipitationen mit Nocodazol synchronisierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden entweder Protein G Sepharose™ 4 *Fast Flow beads* (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben mit 2 µg des jeweiligen Antikörpers gekoppelt oder fertige Flag-M2 *beads* (Sigma Aldrich, Steinheim) verwendet. Es wurden 800- 1000 µg Proteinlysate (NP40-Lysepuffer) mit den *beads* bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurden die *beads* gewaschen, mit 3x SDS-Probenpuffer vermischt, bei 95 °C 5 min aufgekocht und anschließend mittels Western Blot analysiert.



---

#### 2.4.4 Pull-down Assay

---

Anhand dieser Methode lassen sich Proteininteraktionen und potentielle Bindungspartner *in vitro* untersuchen. Dazu wurden 600-1000 µg Proteinlysate Binding-Puffer und gleichen Mengen an den zu untersuchenden rekombinanten bakteriellen GST-Proteinen versetzt und für 1 h auf dem Rotator bei 4 °C inkubiert. Danach wurden jedem Ansatz GST-beads zugefügt und über Nacht bei 4 °C rotiert. Anschließend wurden die beads mehrmals gewaschen (2x Binding-Puffer, 2x PBS) und mit Probenpuffer versetzt. Die Analyse erfolgte durch auftragen auf ein SDS-Gel.

---

#### 2.4.5 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

---

Mit Hilfe dieser Methode können verschiedene Proteine in einer Zelle mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden zuvor transfizierte Zellen in *slide flasks* (Nunc, Langenselbold) kultiviert. Die Fixierung der Zellen erfolgte entweder für 5 min mit kaltem Methanol (-20 °C), in 4 %igem PFA in PBS für 15 min mit anschließender Behandlung mit 0,2 %igem Triton-X-100 in PBS für 5 min bei 4 °C oder nach dem Protokoll von Magiera und Janke (2013). Nach einem 30 minütigen Blocken in ABD Puffer wurde die primären Antikörper in dem gleichen Puffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschrte (je 10 min) mit PBST und anschließend die Inkubation für 30 min mit den sekundären Antikörpern. Danach wurde erneut dreimal 10 min mit PBST gewaschen und anschließend die DNA für 5 min mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Roche, Mannheim) gefärbt und mit Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden mit Vectashield (Vector, CA, USA) eingedeckt und um sie vor dem Austrocknen zu bewahren mit Nagellack oder Klebstoff fixiert. Die slides wurden mittels eines AxioImager.Z1 Mikroskops oder einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica CTR 6500, Heidelberg) untersucht und die Bilder gemacht. Die Auswertung der Bilder erfolgte AxioVision software (Zeiss) oder LAS AF software (Leica).

---

## 2.4.6 Durchflusszytometrie: Zellzyklus

---

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine zu messen. So kann die Zellzyklusverteilung oder der Gehalt bestimmter Proteine bestimmt in Zellen ermittelt werden kann. Zur Bestimmung des Zellzyklus wurden die Zellen trypsiniert und inklusive des Überstands bei 4 °C zentrifugiert und anschließend einmal mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und mit 1 ml 70 %igem kaltem Ethanol für mindestens 30 min oder über Nacht bei 4 °C fixiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl PBS aufgenommen und in spezielle FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) überführt. Die Zellen wurden dann 30 min lang im Dunkeln bei 37 °C mit 100 µl Propidiumiodid (1 mg/ml, Sigma- Aldrich, Steinheim) und 100 µl RNase A (100 µg/ml, Qiagen, Hilden) inkubiert. Für die Bestimmung der Zellzyklusphasen (G0/G1, S oder G2/M) wurden von mindestens 10.000-20.000 Zellen gemessen und der prozentuale Anteil mit dem Programm CellQuest ausgewertet. Zur Messung des phospho-Histon 3 Gehaltes wurden die Zellen trypsiniert und anschließend in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in PBS mit 0,1 % Triton X für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 1 Volumenanteil 4 %igem PFA versetzt und erneut für 15 min bei 37 °C fixiert. Die Zellen wurden gewaschen und für 30 min in ABD mit 10 % FCS geblockt. Dann wurde das Pellet in 100 µl ABD+10% FCS mit 1:200 Maus-pHH3-Antikörper bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit Zweitantikörper (Maus-IgG FITC, DAKO) 1:20 für 30 min bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 500 µl PBS resuspendiert und die FACS-Messung durchgeführt.

---

## 2.4.7 *In vitro* MT Depolymerisations assay

---

Der *in vitro* Mikrotubuli Depolymerisations assay wurde mit einigen Modifikation wie beschrieben (Ritter et al., 2015) durchgeführt. Dazu wurde mit x-Rhodamine markierte Rindergehirn Tubulin Heterodimere (Cytoskeleton Inc, Biomol) in G-PEM Puffer (80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 1 mM dGTP und 10 % Glycerol) bei 37°C für 20 min polymerisiert und anschließend stabilisiert mit 50 µM Taxol für 5 min bei 37°C. Der Versuch wurde in 50 µl Reaktionspuffer mit 0.5 µl polymerisierten MTs, G-PEM Puffer mit 30% Glycerol, 1 mM ATP, 20 µM Taxol und 25 nM GST-RITA oder den Mutanten bei 37°C durchgeführt. Dabei diente GST-MCAK, eine MT Depolymerase, als Positivkontrolle (Ritter

---

et al., 2015). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200  $\mu$ M Taxol gestoppt und von der Reaktion 5  $\mu$ l auf in Glasobjektträger pipettiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert mit der Software AxioVision SE64 Re. 4.9. Zur Visualisierung von GST-RITA, wurde nach Beendigung der Reaktion, die MTs auf einen Glasobjektträger gefügt und zusätzlich mit RITA Antikörper (Sigma Aldrich, Steinheim) und FITC anti-Maus gefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

---

#### 2.4.8 MT-Fraktionierung

---

Die MT-Fraktionierung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt (Nguyen et al., 1999). Dazu wurden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufgenommen, das Zellpellet geteilt. Nach Zentrifugation (1000 rpm, 3 min), wurden eine Hälfte der Zellen in 1 ml MT-Stabilisierungspuffer (MSB; 85 mM Pipes, pH 6.93, 1 mM EGTA, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 M Glycerol) resuspendiert, die andere Hälfte in 1 ml MSB Puffer mit 0.1 % Triton X-100. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37°C und Zentrifugation bei RT (2500 rpm, 3 min), wurden die Zellen mit Lysepuffer versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Proteingehalt mittels Bradford *assay* bestimmt. Für die Fraktionierung von löslichen und polymerisierten Tubulin (Sharma et al., 2011), wurde der Extraktionspuffer A für das lösliche Tubulin (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerol) zu den Zellen gegeben und bei 4°C für 3 min rotiert. Anschließend wurde der Überstand als lösliche Fraktion in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Direkt danach wurde das verbleibende Zellpellet mit dem Extraktionspuffer B für das polymerisierte Tubulin (A + 1% SDS) versetzt und sonifiziert. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Beide Fraktionen wurden mittels Bradford *assay* gemessen.

---

## 3 Ergebnisse

---

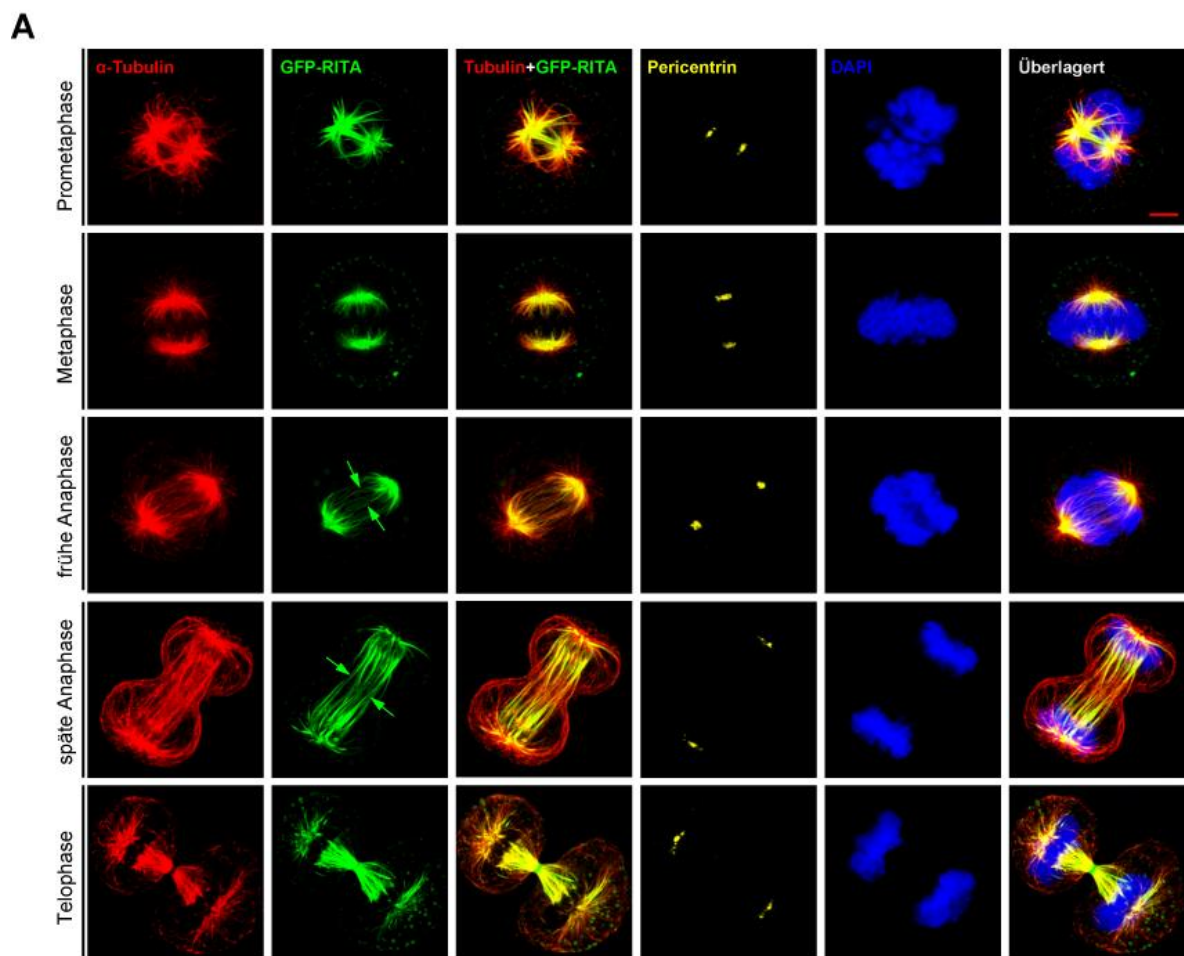
### 3.1 Die Rolle von RITA in der Mitose

---

#### 3.1.1 RITA ist assoziiert mit mitotischen Strukturen und Tubulin

---

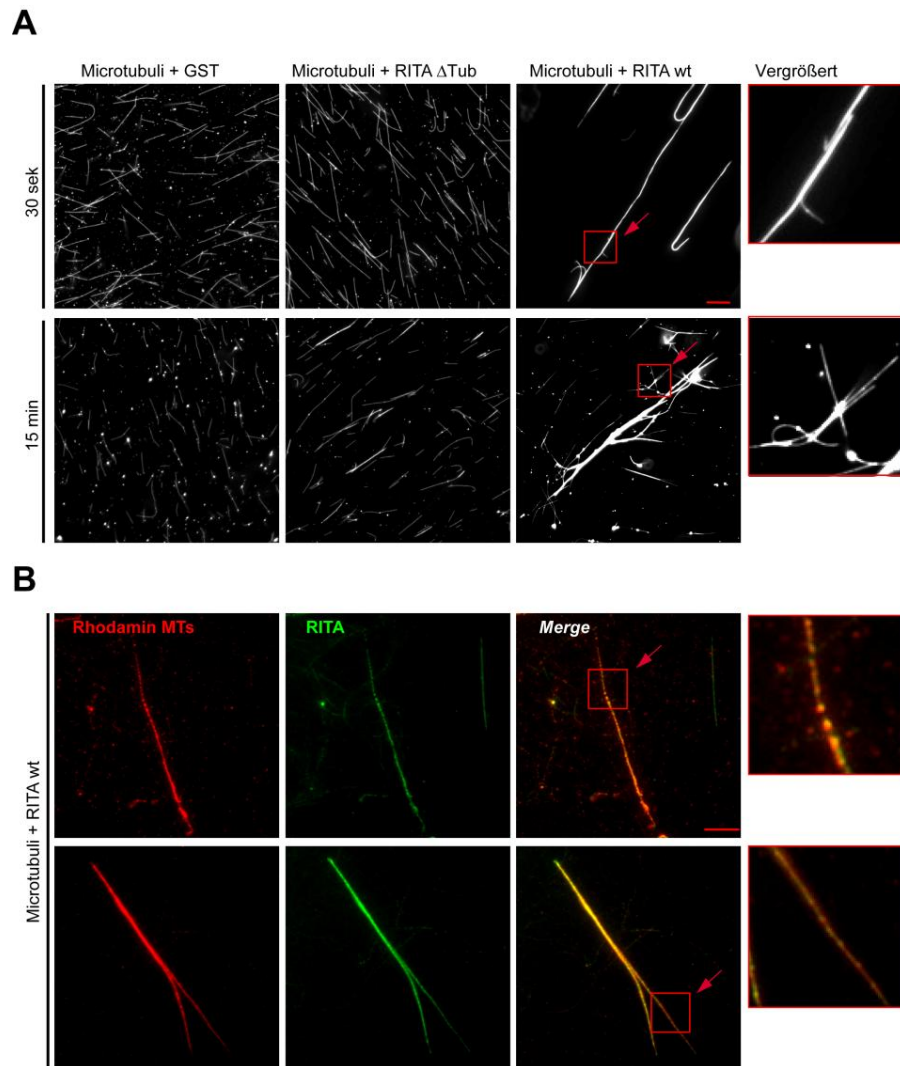
Um die Lokalisation von RITA während der Mitose zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit GFP-RITA transfiziert. Mittels Immunfluoreszenz Analyse wurde die genaue Lokalisation von RITA in den einzelnen mitotischen Subphasen betrachtet (Abbildung 3-1).



**Abbildung 3-1:** RITA lokalisiert an die mitotischen Spindel. (A) HeLa Zellen wurden mit 0.5 µg GFP-RITA transfiziert und gefärbt wurden  $\alpha$ -Tubulin, Pericentrin und die DNA für Konfokale Mikroskopie. Beispiele zeigen GFP-RITA Lokalisation während der Mitose. Grüne Pfeile weisen auf interpolare MTs hin. Maßstabsbalken: 5 µm.

In der Prometaphase lokalisiert RITA komplett an die MTs sowie in der Metaphase (Abbildung 3-1, Reihe 1 und 2, GFP-RITA). In der Metaphase ist auch eine schwache Lokalisation an den Astral-MTs zuerkennen. In der Anaphase ist RITA an den Spindelpol-MTs und den interpolare MTs sichtbar (Abbildung 3-1, Reihe 3 und 4, grüne Pfeile). Auch an

der Zentralspindel ist RITA demonstrativ (Abbildung 3-1, Reihe 5). RITA lokalisiert somit in der Mitose an Astral-MTs, *k-fibers*, interpolar MTs und die Zentralspindel. Zu bemerken ist, dass die Verteilung von RITA an der Zentralspindel Gradienten-ähnlich verteilt ist (Abbildung 3-1, Reihe 4, GFP-RITA). Um die exakte Assoziation von RITA mit den MTs zu untersuchen, wurde in Kooperation mit dem Biophysik Institut der Universität Ulm und F. Oswald (Universitätsklinik Ulm) die Methode der *stochastic optical reconstruction microscopy* (dSTORM) verwendet. Die MTs in HeLa Zellen, besonders die dickeren MTs sind mit GFP-RITA überzogen. Die MTs in Zellen mit exogenem RITA zeigten eine irreguläre Verteilung (Steinhäuser et al., 2016). Die dSTORM Daten zeigen, dass RITA an der Oberfläche von MTs lokalisiert ist und auch deren Struktur beeinflusst, da die Überexpression zu dickeren und irregulären MTs führt. Um die dSTORM Daten weiter zu untermauern, wurde ein *in vitro* MT Depolymerisationsexperiment (Pakala et al., 2012; Ritter et al., 2015b) durchgeführt.



**Abbildung 3-2:** Im *In vitro* Depolymerisation assay werden MTs durch RITA gebündelt. (A) Stabilisierte MTs wurden mit 25 nM GST Kontroll-Protein, GST-RITA  $\Delta$ tub oder GST-RITA inkubiert und nach 30 Sekunden und 15 Minuten Bilder aufgenommen. Beispiele sind gezeigt. Rote Pfeile zeigen die 6-fach vergrößerten Boxen. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m. (B)

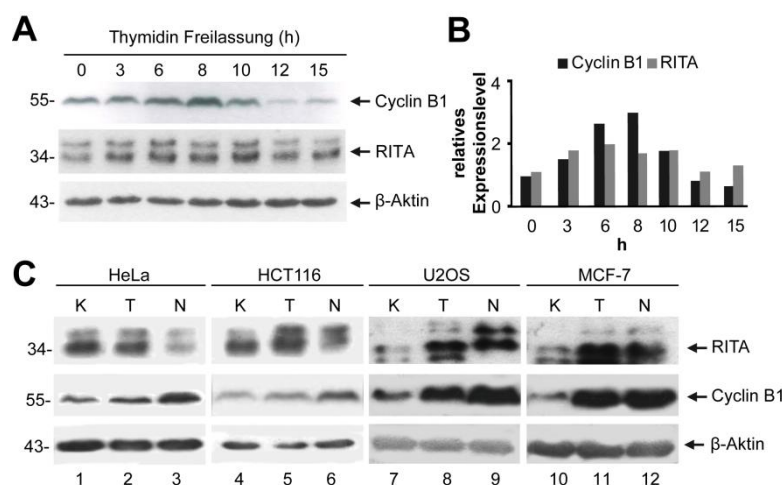
Rhodamine markierte MTs wurden mit GST-RITA inkubiert und dann mit einem RITA spezifischen Antikörper gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Rote Pfeile zeigen die 6-fach vergrößerten Boxen. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m.

Im Vergleich zu MTs, die nur mit GST-Protein inkubiert wurden (Abbildung 3-2 A, links), zeigten MTs welche mit GST-RITA inkubiert wurden, erneut irreguläre MT Strukturen nach circa 30 Sekunden (Abbildung 3-2 A, rechts). Die  $\Delta$ tub-Mutante dagegen, bei der die letzten 12 Aminosäuren des C-Terminus fehlen und diese somit nicht mehr effektiv an Tubulin bindet, zeigte diese Strukturen weniger (Abbildung 3-2 A, Mitte).

Durch eine Immunfluoreszenz-Färbung konnte gezeigt werden, dass RITA an diese irregulären MTs *in vitro* bindet (Abbildung 3-2 B). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass RITA an die Oberfläche der MTs lokalisiert, die Struktur und das Verhalten von diesen MTs beeinflusst.

### 3.1.2 RITA ist während des Zellzykluses exprimiert und bindet an Tubulin

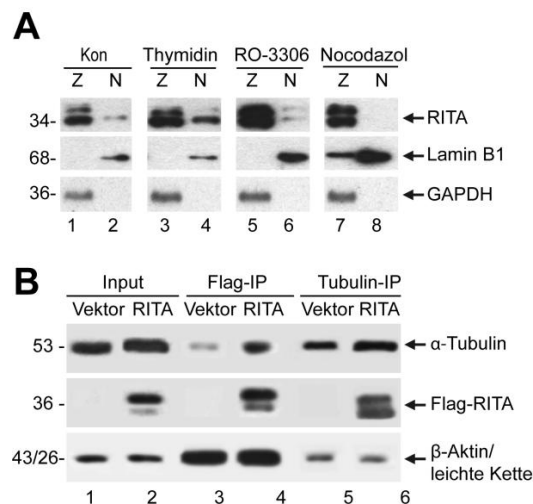
Um die Expression von RITA während des Zellzyklus genauer zu untersuchen, wurden HeLa Zellen mit einem Doppel-Thymidin-Block arretiert, anschließend in Medium ohne Thymidin entlassen und zu bestimmten Zeitpunkte für Western Blot Analysen geerntet. Während Cyclin B1 in der Mitose ansteigt (Abbildung 3-3 A, Reihe 1, 6 h) und mit Beginn der Anaphase abnimmt (Abbildung 3-3 A, Reihe 1, 10 h), ist das Expressions-level von RITA während des Zellzyklus relativ konstant. In der Mitose steigt das Level leicht an und fällt zur G1-Phase wieder etwas ab (Abbildung 3-3 A und B, 6 h, 8 h und 10 h).



**Abbildung 3-3:** RITA ist im Zellzyklus exprimiert. (A) HeLa Zellen wurden mit einem Doppel-Thymidin Block synchronisiert, in frisches Medium entlassen und zu bestimmten Zeitpunkt für Western Blot Analyse geerntet. Antikörper gegen Cyclin B1 und RITA wurden gefärbt. Cyclin B1 und β-Aktin dienten als Mitose- und Lade-Kontrolle. (B) Quantifizierung des Proteinlevels von RITA und Cyclin B1 aus A, relativiert zu β-Aktin. (C) Western Blot Analyse. HeLa

Zellen wurden mit Nocodazol synchronisiert und mitotische Zellen mittels *shake-off* gesammelt und in Medium mit CHX (25 µg/ml) für die angegebenen Zeitpunkte gegeben. Cyclin B1, Polo-like kinase 1 (Plk1) und  $\beta$ -Aktin dienten als Mitose- und Lade-Kontrolle.

Das Protein Expressionsmuster von RITA wurde zudem in HeLa Zellen, die in verschiedene Zellzyklusphasen synchronisiert wurden, mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3-3 C). RITA wird in der Interphase, im G1/S Übergang und in der Prometaphase in der Zervix Karzinom-Zelllinie HeLa, Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116, Osteosarkom-Zelllinie U2OS und der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 exprimiert, wenngleich das Level in den Zellzyklusphasen und den verschiedenen Zelllinien variiert (Abbildung 3-3 C, Reihe 1). Zu bemerken ist, dass Doppel- bzw. Dreifach-Banden beobachtet wurden, die auf mögliche Postmodifikation schließen lassen. Diese Ergebnisse weisen auf eine individuelle dynamische Kontrolle des Proteinlevels von RITA, abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext, hin. Zusätzlich wurde gezeigt, dass RITA hauptsächlich im Zytoplasma in nicht-synchronisierten Zellen, beim G1/S Übergang und in der G2 Phase vorliegt und nur wenig im Kern vorhanden ist (Abbildung 3-4 A).



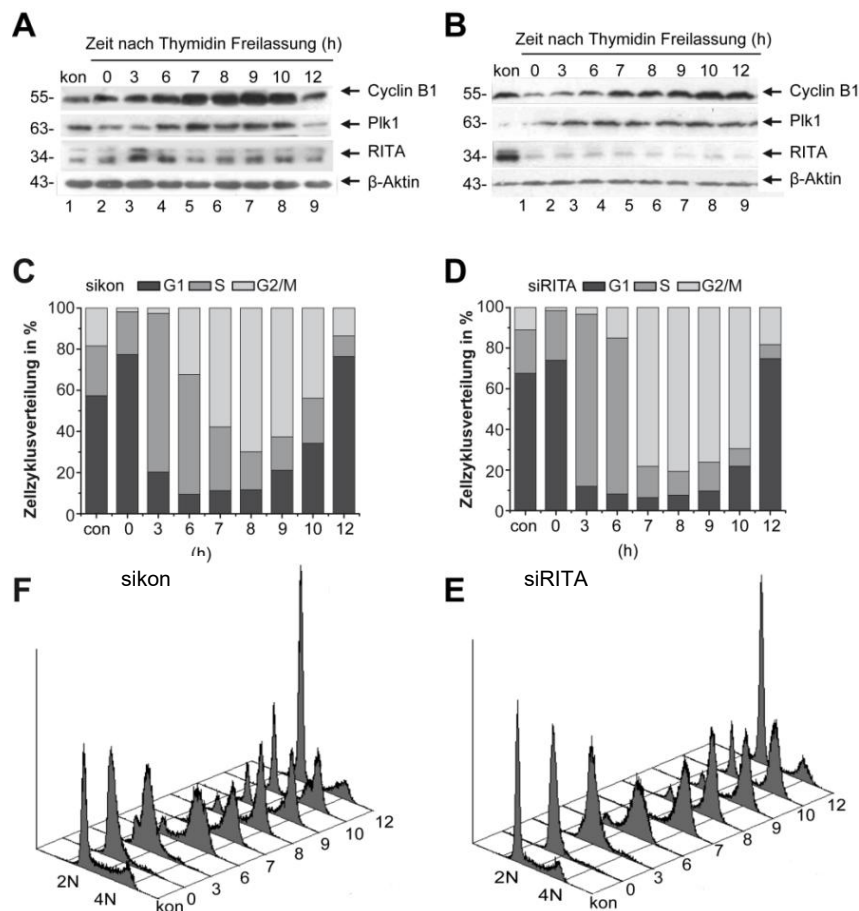
**Abbildung 3-4:** RITA ist im Zytoplasma lokalisiert und bindet an  $\alpha$ -Tubulin. (A) HeLa Zellen wurden entweder mit einem Doppel-Thymidin-Block (G1/S), dem Cdk1 Inhibitor RO-3306 für 16 h (G2) oder Nocodazol für 14 h (Prometaphase) behandelt. Kern- und Zytoplasma Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert. Kon: un-behandelt; Z: Zytoplasma Fraktion; N: Kern Fraktion. Lamin B1 und GAPDH wurden als Kern- bzw. Zytoplasma Marker verwendet. (B) HeLa Zellen, die Flag-RITA überexprimieren, wurden mit Nocodazol synchronisiert und Immunpräzipitationen wurden durchgeführt. Western Blot.  $\beta$ -Aktin und leichte Kette des IgG dienten als Ladenkontrolle.

Schließlich konnte noch gezeigt werden, dass Flag-RITA mit  $\alpha$ -Tubulin präzipitiert und somit die Interaktion von RITA mit Tubulin bestätigt werden (Abbildung 3-4 B).

## 3.2 Die Depletion von RITA beeinflusst die Zellzyklus Progression

### 3.2.1 Zellen ohne RITA zeigen einen veränderten Zellzyklus

Durch die vorherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass RITA während des gesamten Zellzyklus exprimiert wird. Die nächste Fragestellung war, wie sich Zellen ohne RITA im Zellzyklus verhalten. Dazu wurden HeLa Zellen mit Kontroll-siRNA oder siRNA gegen die kodierende Region von RITA transfiziert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Doppel-Thymidin-Block arretiert und in Medium ohne Thymidin für Western Blot Analysen entlassen (Abbildung 3-5 A und B). Zellen mit endogenem RITA zeigen eine normale Progression durch den Zellzyklus (Abbildung 3-5 A). Cyclin B1 steigt in der Mitose an (Abbildung 3-5 A, Reihe 1, 7 h und 8 h) und fällt nach Eintritt in die Anaphase wieder ab (Abbildung 3-5 A, Reihe 1, 10 h und 12 h).



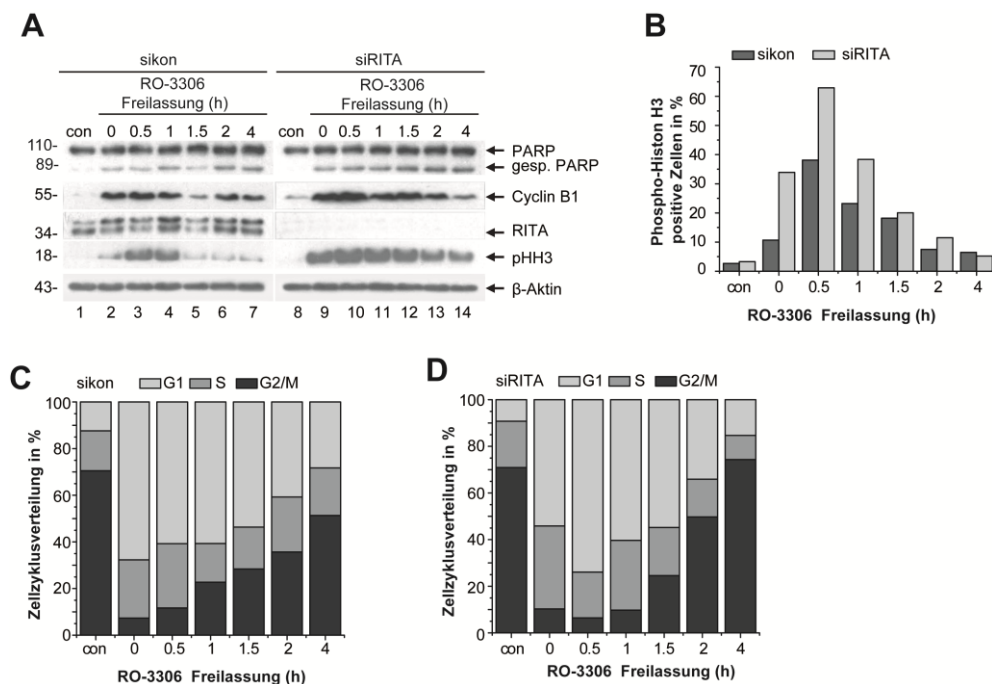
**Abbildung 3-5:** Die Depletion von RITA beeinflusst die Zellzyklusprogression. (A) und (B) HeLa Zellen wurden mit einem Doppel-Thymidin-Block synchronisiert, in frisches Medium entlassen und zu bestimmten Zeitpunkten für Western Blot Analyse geerntet und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt.  $\beta$ -Aktin diente als Lade-Kontrolle. (C) und (D) Analyse der Zellzyklus-Verteilung von sikon und siRITA. (F) und (E) FACS Zellzyklus-Profil von sikon und siRITA.



Bei Zellen ohne RITA (Abbildung 3-5 B, Reihe 3) zeigte sich zwar ein Cyclin B1 Anstieg bei 8 h, jedoch verblieben die Zellen länger in der Mitose, wie an dem noch vorhandenen Cyclin B1 Signal bei 10 h und 12 h zu erkennen ist. Zusammenfassend deutet dies auf eine fehlerhafte Zellzyklusprogression hin. Die Zellzyklusprogression wurde zusätzlich mittels FACS Analyse untersucht. Auch dort zeigte sich, dass Zellen ohne RITA länger in der Mitose (G2/M) verblieben als Kontrollzellen (Abbildung 3-5 C und D). Dies ist auch in den FACS Histogrammen (Abbildung 3-5 E und F) zu erkennen.

### 3.2.2 Zellen ohne RITA zeigen einen verzögerten Austritt aus der Mitose

Um die beobachtete Verzögerung in der mitotischen Progression genauer zu untersuchen, wurde eine Kinetik mit dem Cdk1-Inhibitor RO-3306 (Vassilev et al., 2006) durchgeführt. HeLa Zellen wurden mit Kontroll-siRNA und siRNA gegen RITA transfiziert und 24 Stunden später mit RO-3306 (9  $\mu$ M) für 14 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium entlassen und zu nach bestimmten Zeitpunkten für Western Blot Analysen geerntet. Zellen mit RITA zeigten einen normalen Verlauf, nach 1 h traten die Zellen aus der Mitose aus, was anhand des Cyclin B1 und des phospho-Histon H3 Signals deutlich zu erkennen ist (Abbildung 3-6 A, Reihe 2 und 4, Spalte 4).



**Abbildung 3-6:** Zellen ohne RITA treten langsamer aus der Mitose aus. (A) HeLa Zellen wurden mit siRNA transfiziert und dann RO-3306 synchronisiert, in frisches Medium entlassen und zu bestimmten Zeitpunkt für Western Blot Analysen geerntet und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt.  $\beta$ -Aktin diente als Lade-Kontrolle. (B) Messung und Auswertung des phospho-Histon H3 Levels mittels FACS (C) und (D) FACS Analyse der Zellzyklus-Verteilung von sikon und siRITA aus (A).

---

Zellen ohne RITA zeigten dagegen einen verzögerten Austritt aus der Mitose, denn das Cyclin B1 und phospho-Histon H3 Signal waren nach einer Stunde immer noch deutlich erhöht bis hin zu vier Stunden nach Freilassung der Zellen (Abbildung 3-6 A, Reihe 2 und 4). Zusätzlich wurde der phospho-Histon H3 Gehalt mittels FACS gemessen (Abbildung 3-6 B). Auch hier zeigte sich ein deutlich erhöhtes phospho-Histon H3 Level bei Zellen ohne RITA sowie ein verzögerter Austritt aus der Mitose. Die Zell-zyklusverteilung der RITA depletierten Zellen zeigte zwar eine kleine Anreicherung in der G2/M Phase (Abbildung 3-6 D, 2 h und 4 h), aber da in dieser Messung nicht zwischen G2- und M-Phase diskriminiert werden kann und auch eine erhöhte Apoptoserate in diesen Zellen beobachtet werden konnte (Abbildung 3-6 A, Reihe 1), ist der Effekt der Depletion nicht so prominent wie in der phospho-Histon H3 FACS Messung. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass RITA wichtig für einen ungestörten Verlauf der Mitose ist und dass Zellen ohne RITA einen verzögerten mitotischen Austritt aufweisen.

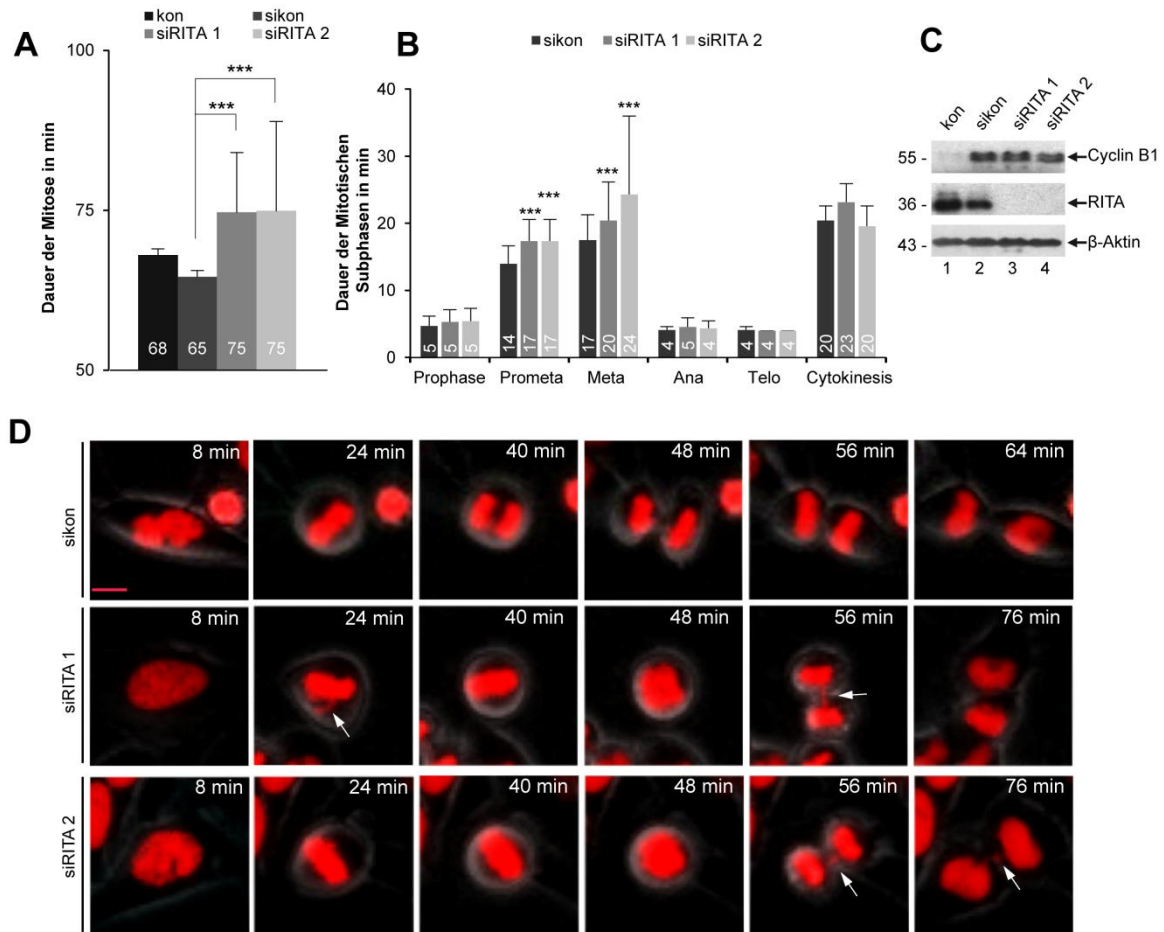
---

### 3.2.3 Time-lapse Mikroskopie zeigt verlängerte mitotische Sub-Phasen

---

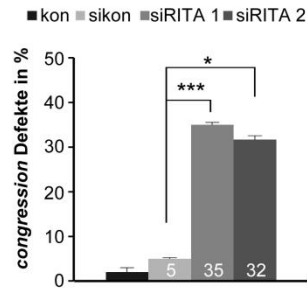
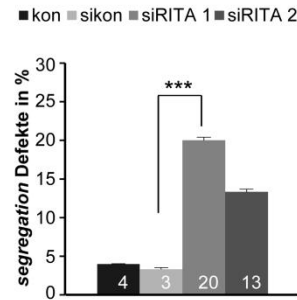
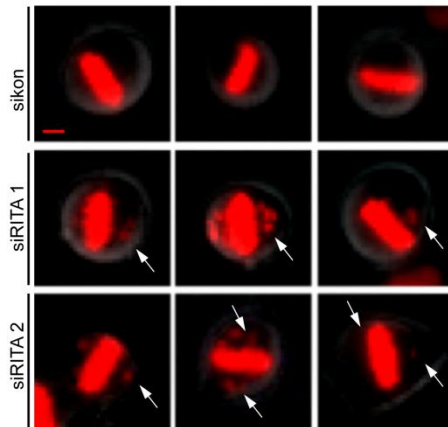
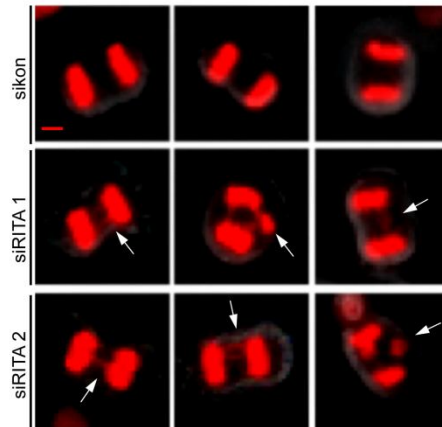
Zur genaueren Analyse von RITA's Einfluss auf die Zellzyklus-Progression, wurde die Technik der *Time-lapse* Mikroskopie für lebende Zellen verwendet. Dazu wurden HeLa Zellen, die stabil H2B-tdTomato exprimieren, mit Kontroll-siRNA und den zwei siRNAs gegen RITA transfiziert (Abbildung 3-7 C). Die Einzelzell-Analyse durch die *Time-lapse* Mikroskopie ergab, dass Zellen mit Kontroll-siRNA 65 Minuten benötigten, um die Mitose komplett zu durchlaufen. Dabei wurde der Beginn der Chromosomen Kondensation als Start und die Formation einer Zytoplasma-Membran als Endpunkt der Mitose festgelegt. HeLa Zellen ohne RITA benötigten dagegen 75 Minuten zum Durchlaufen der Mitose (Abbildung 3-7 A), dies entspricht einer Verlängerung um 15 %. Des Weiteren ergab die Analyse der mitotischen Subphasen, dass in Zellen ohne RITA die Prometa- und die Metaphase deutlich verlängert sind (Abbildung 3-7 B). Zudem konnte beobachtet werden, dass Zellen ohne RITA im Vergleich zu Kontroll-Zellen, vermehrte Chromosomendefekte aufwiesen, hauptsächlich Metaphase-Chromosomendefekte (*congression*) und Anaphase-Chromosomendefekte (*segregation*) (Abbildung 3-7 D, weiße Pfeile). Anhand dieser Daten wurde deutlich, dass RITA eine wichtige Rolle in der mitotischen Progression spielt und es durch eine verlängerte Mitose die Häufigkeit von Chromosomendefekten in der Metaphase und Anaphase zunimmt.

Da diese Zellen vermehrt Fehler in der Chromosomenanordnung aufwiesen, wurden diese zusätzlich zur Dauer der Mitose genauer analysiert.



**Abbildung 3-7:** HeLa-Zellen zeigen eine verlängerte Mitose in Abwesenheit von RITA. (A) Auswertung der Mitose Dauer. HeLa-Zellen mit stabil exprimierenden H2B-tdTomato wurden mit Kontroll-siRNA (sikon), siRNA gegen die kodierende Region (siRITA 1) oder 3'-untranslatierte Region (siRITA 2) von RITA behandelt und mittels *Time-lapse* Mikroskopie analysiert. Zeit (min) für die Dauer der Mitose wurde ausgewertet (n = 60 Zellen pro Bedingung). Nicht behandelte HeLa-Zellen wurden als Kontrolle (kon) verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD und statistisch ausgewertet dargestellt. \*\*\* p < 0,001. (B) Die Dauer der mitotischen Subphasen, Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese wurde erfasst (n = 60 Zellen pro Bedingung). Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD dargestellt. \*\*\* p < 0,001. (C) Western-Blot-Analyse für siRNA Behandlung. β-Aktin diente als Ladekontrolle. (D) Exemplarische Beispiele jeder Bedingung. Weiße Pfeile: defekte Chromosomenanordnung während der Meta- bzw. Anaphase. Maßstab: 10 μm.

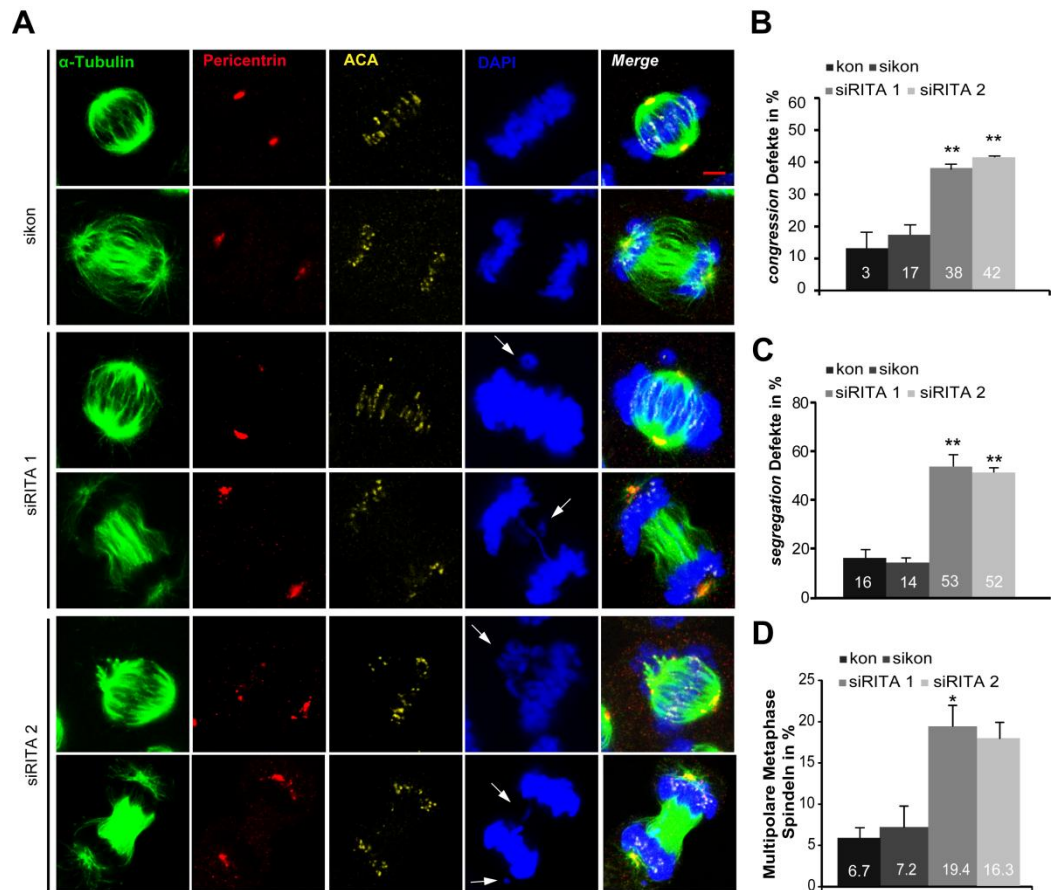
Zellen mit endogenem RITA zeigten dabei circa 5 % fehlerhafte Chromosomenanordnungen in der Metaphase (Abbildung 3-8 A und C) und 3 % mehr fehlerhafte Chromosomenanordnungen in der Anaphase (Abbildung 3-8 B und D). Zellen ohne RITA dagegen wiesen in der Metaphase 30 % mehr fehlerhafte Chromosomenanordnung (Abbildung 3-8 A und C) und in der Anaphase 17 % fehlerhafte Chromosomenanordnungen auf (Abbildung 3-8 B und D).

**A****B****C****D**

**Abbildung 3-8:** Fehlerhafte Chromosomenanordnung nach Depletion von RITA. (A) und (B) Auswertung der mitotischen Defekte. HeLa-Zellen mit stabil exprimierendem H2B-tdTomato wurden mit Kontroll-siRNA (sikon), siRNA gegen die kodierende Region (siRITA 1) oder 3'-untranslatierte Region (siRITA 2) von RITA transfiziert und mittels *Time-lapse* Mikroskopie analysiert (n=2 je 60 Zellen pro Bedingung). Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM und statistisch ausgewertet dargestellt. \*\*\*  $p < 0,001$ . (C) und (D) Exemplarische Beispiele jeder Bedingung. Weiße Pfeile: defekte Chromosomenanordnung in der Meta- bzw. Anaphase. Maßstab: 10  $\mu$ m.

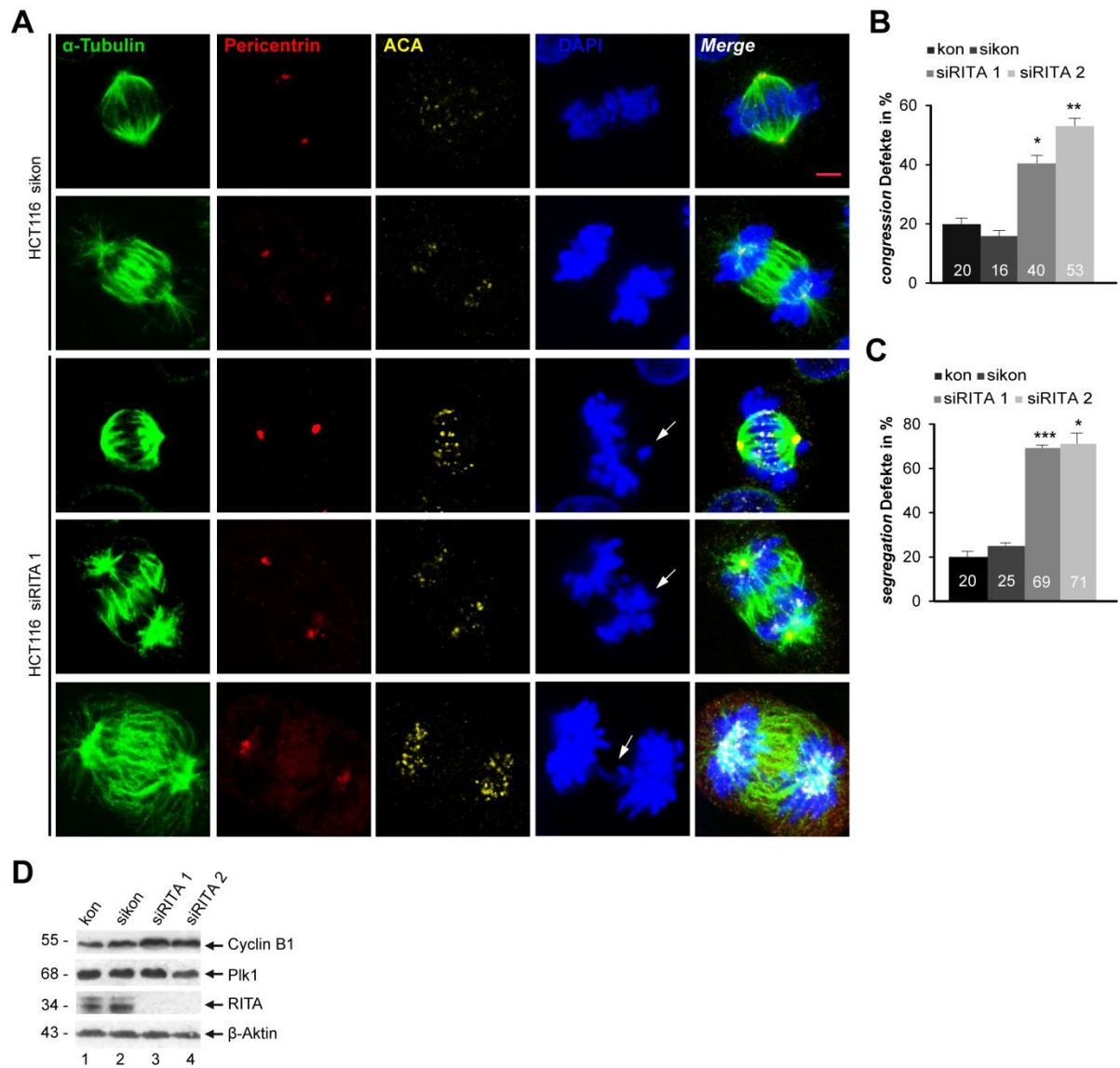
In der Anaphase wiesen diese Zellen dazu noch Chromosomenbrücken (*chromosome bridges*) und auch *lagging* Chromosomen auf (Abbildung 3-8 D, weiße Pfeile). Durch diese Ergebnisse wird deutlich, dass RITA eine wichtige Rolle in der Mitose spielt und diese Zellen erhebliche Probleme in der Chromosomenanordnung haben.

Um die beobachteten mitotischen Fehler genauer zu analysieren, wurden HeLa Zellen mit beiden siRNAs gegen RITA transfiziert (Abbildung 3-11 C) und anschließend mittels Konfokaler Lasermikroskopie analysiert (Abbildung 3-9 A). Die Auswertung des Phänotyps ergab, dass diese Zellen circa 9-16 % mehr Spindeln mit monopolem Phänotyp (Abbildung 3-9 D) und in der Metaphase 21-25 % fehlerhafte Chromosomenanordnungen aufwiesen (Abbildung 3-9 A, Reihe 3 und 5 DNA, und C). In der Anaphase zeigten sich 35 % fehlerhafte Chromosomenanordnungen (Abbildung 3-9 A, Reihe 4 und 6 DNA, und D), verglichen mit Kontroll-Zellen.



**Abbildung 3-9:** Mitotische Defekte und Multipolarität in HeLa Zellen ohne RITA. (A) HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (sikon), siRNA gegen die kodierende Region (siRITA 1) oder 3'-untranslatierte Region (siRITA 2) von RITA behandelt und die Zentromere (ACA, *anti-centromere antibody*), Pericentrin,  $\alpha$ -Tubulin und DNA für Konfokale Mikroskopie gefärbt. Beispiel sind gezeigt. Weiße Pfeile zeigen Chromosomen Defekte. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B and C) Auswertung der Chromosom Defekte (B) und fehlerhaften Segregation (C) in Zellen ohne RITA (n = 90 mitotische Zellen pro Bedingung). Die Ergebnisse sind von drei unabhängigen Experimenten und als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0.01. (D) Auswertung der Multipolarität in Zellen ohne RITA (n=120 Metaphase Zellen pro Bedingung).

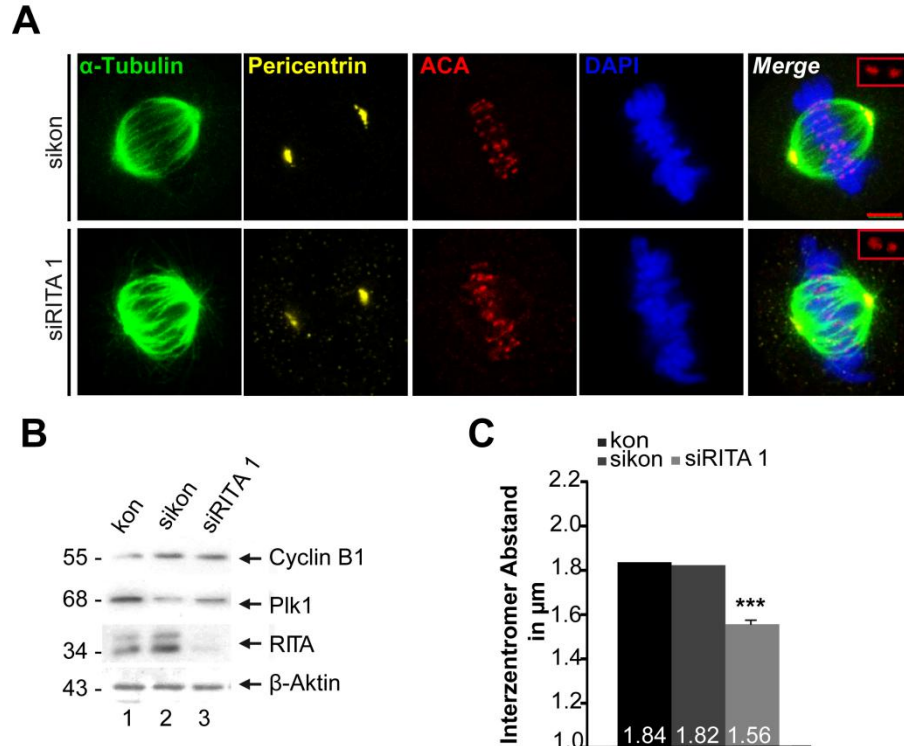
Die gleichen Ergebnisse konnten auch in einer zweiten Zelllinie, den HCT116, beobachtet werden. Dazu wurden die Zellen mit beiden siRNAs gegen RITA transfiziert (Abbildung 3-10 D) und anschließend mittels Konfokaler Lasermikroskopie analysiert (Abbildung 3-10 A). Die Auswertung des Phänotyps ergab, dass diese Zellen in der Metaphase 21-25 % fehlerhafte Chromosomenanordnungen aufwiesen (Abbildung 3-10 B) und in der Anaphase zeigten sich 35 % fehlerhafte Chromosomenanordnungen (Abbildung 3-10 C), verglichen mit Kontroll-Zellen.



**Abbildung 3-10:** Mitotische Defekte und Multipolarität in HCT116 Zellen ohne RITA. (A) HCT116-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (sikon), siRNA gegen die kodierende Region (siRITA 1) oder 3'-untranslatierte Region (siRITA 2) von RITA behandelt und die Zentromere (ACA, *anti-centromere antibody*), Pericentrin,  $\alpha$ -Tubulin und DNA für Konfokale Mikroskopie gefärbt. Beispiel sind gezeigt. Weiße Pfeile zeigen Chromosomen-Defekte während der Metaphase. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B und C) Auswertung fehlerhaften Chromosomenanordnung in Zellen ohne RITA (n = 90 mitotische Zellen je Bedingung). Die Ergebnisse sind von drei unabhängigen Experimenten und als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0.01. (D) Kontroll Western Blot für siRNA Transfektion.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

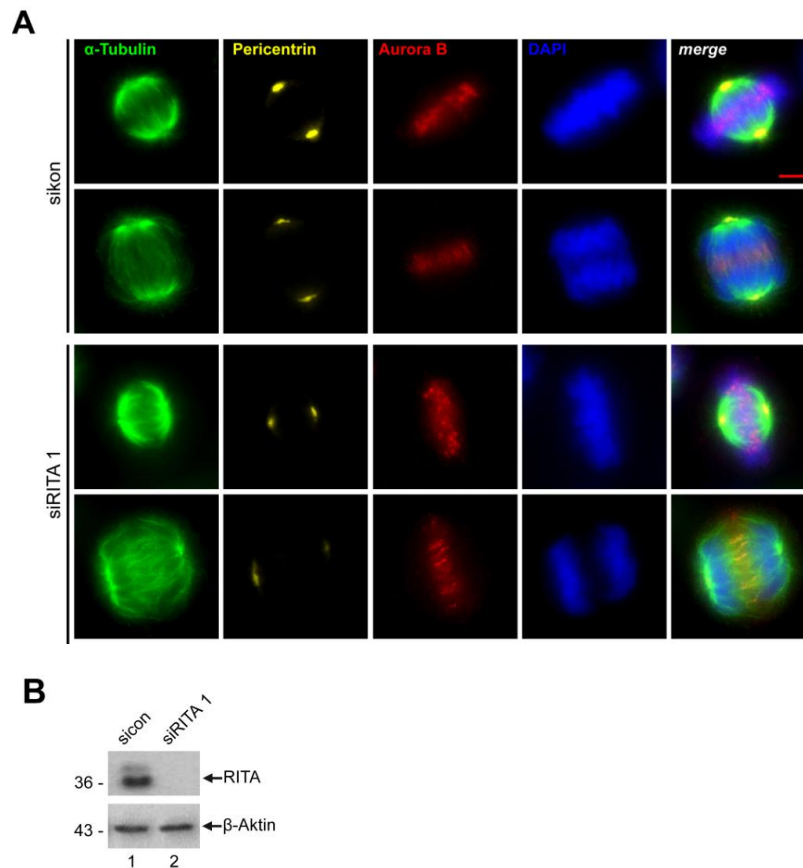
Um die Ursachen für die beobachteten chromosomalen Defekte zu untersuchen, wurde mittels ACA-Färbung (*anti-centromere Antibody*) der Abstand zwischen den Geschwister-Zentromeren in der Metaphase gemessen (Abbildung 3-11 A), der einen funktionalen Marker für die korrekte Verknüpfung der MTs an die Kinetochore darstellt. Der Abstand der Geschwister-Zentromere war signifikant verkürzt in Zellen ohne RITA (Abbildung 3-11 B).





**Abbildung 3-11:** Verkürzter Zentromerabstand in RITA depletierten HeLa Zellen. (A) HeLa Zellen wurden fixiert und mit  $\alpha$ -Tubulin, Pericentrin, ACA und DAPI gefärbt. Beispiel Exemplare sind gezeigt. Geschwister-Zentromere sind in 2.5-facher Vergrößerung dargestellt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Zentromer-Abstand Auswertung in Metaphase Zellen. Der Abstand zwischen zwei gepaarten Zentromeren wurde mittels LAS AF Software gemessen (n = 50 Paare je Bedingung). Die Ergebnisse sind von zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. \*\*\*p<0.001. (C) Kontrol Western Blot für siRNA Transfektion.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Da Aurora B für den Aufbau der Spannung durch die Korrektur von Fehlverknüpfungen zwischen MTs und Kinetochoren (Carmena et al., 2012) verantwortlich ist, wurde die Lokalisierung von Aurora B an den Kinetochoren/Zentromeren genauer untersucht. Es konnten keine deutlichen Veränderungen zwischen Kontroll-Zellen und Zellen ohne RITA festgestellt werden (Abbildung 3-12 A).



**Abbildung 3-12:** Die Lokalisation von Aurora B ist nicht negativ beeinflusst in Abwesenheit von RITA. (A) RITA Depletion beeinflusst die Lokalisation von Aurora B nicht. HeLa Zellen wurden mit siRITA 1 behandelt und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Kontroll Western Blot für siRNA Transfektion.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

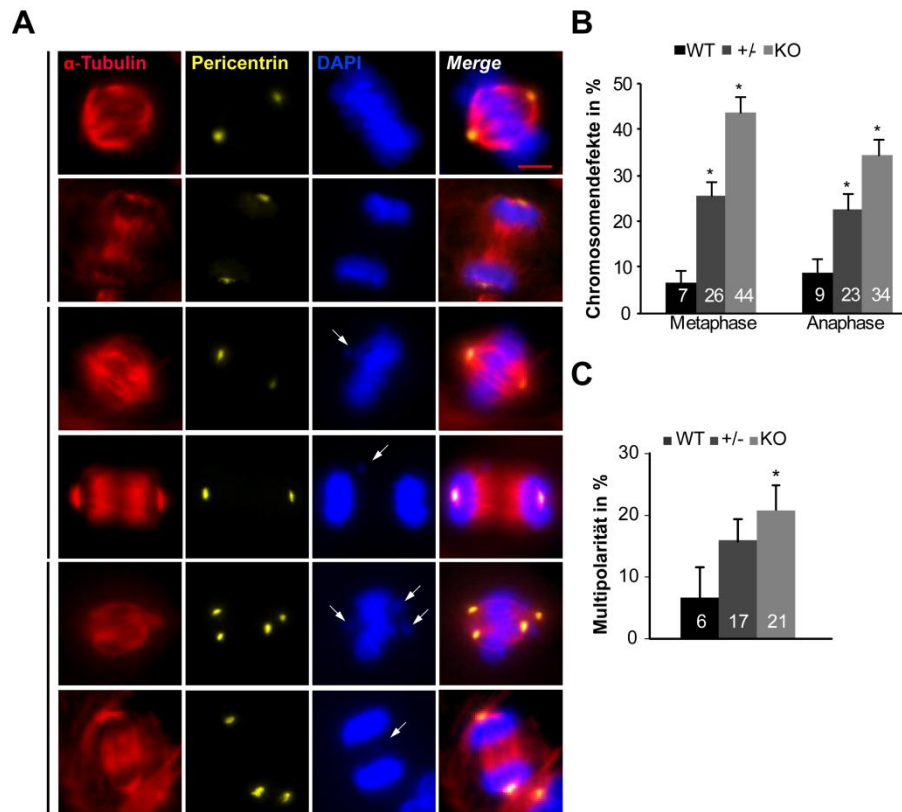
Diese Beobachtung impliziert, dass der reduzierte Abstand der Schwester-Zentromere nicht von einer delokalisierten Aurora B Kinase verursacht wird, sondern weist auf andere Faktoren hin, wie zum Beispiel eine deregulierte MT Dynamik in Zellen ohne RITA, die wiederum zu Defekten in der Chromosomenanordnung während der Mitose führen kann.

### 3.2.4 Fibroblasten aus RITA KO-Mäusen zeigten fehlerhafte Chromosomenanordnung und Multipolarität

Um die Funktion von RITA *in vivo* zu charakterisieren, wurden Knockout-Mäuse von Prof. Dr. Franz Oswald (Universitätsklinik Ulm) generiert (Steinhäuser *et. al.*, 2016. In Druck). Embryonale Maus-Fibroblasten (MEF) wurden von Wildtyp, heterozygot (+/-) und homozygote (-/-) Mäuse für die zelluläre Analyse isoliert. Interessanterweise zeigten relativ zu Kontrollzellen, RITA -/- MEFs 37 % mehr falsch angeordnete Chromosomen und 25 % mehr fehlerhafte Chromosomensegregation, während die +/- MEFs 19% mehr



Chromosomendefekte und 14 % mehr Fehlerhafte Chromosomensegregation zeigten (Abbildung 3-13, A und B).



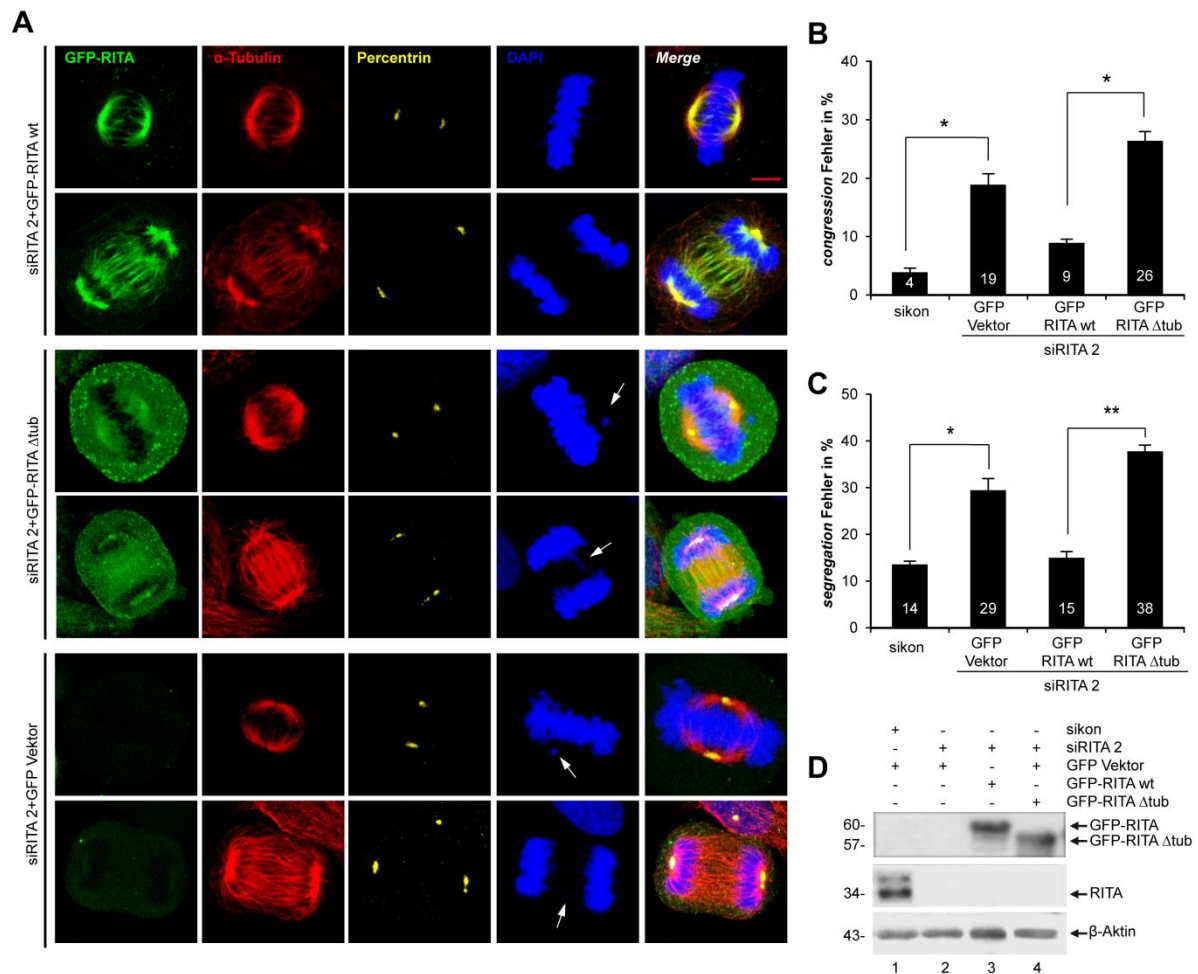
**Abbildung 3-13:** Mitotischen Defekte in RITA KO und RITA +/- MEFs. (A) MEFs wurden für die Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m. Weiße Pfeile zeigen Fehlerhafte Chromosomenanordnung. (B) Auswertung der Chromosomenfehler. (C) Auswertung der Multipolaren Spindeln (A) in MEFs. Die Ergebnisse basieren auf zwei unabhängigen Experimenten (n = 2, 75 Meta- oder Anaphasen je Bedingung) und sind als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. \* p < 0.05.

Es gab deutlich mehr multipolare Spindeln in den RITA KO MEFs und den RITA +/- MEFs als in denen mit Wildtyp RITA (Abbildung 3-13 C). Diese *in vivo* Daten untermauern die vorherigen Ergebnisse und zeigen, dass RITA eine wichtige Rolle in der Mitose spielt.

### 3.2.5 Wild-Typ RITA aber nicht RITA $\Delta$ tub korrigieren die mitotischen Defekte

Um zu überprüfen, ob die beobachteten Defekte direkt mit der Depletion von RITA assoziiert sind, wurden *rescue* Experimente durchgeführt. Zellen in denen RITA effizient depletiert wurde (Abbildung 3-14 D, zweite Reihe) und erfolgreich mit vergleichbarem Level an exogenem Wild-Typ GFP-RITA oder GFP-RITA  $\Delta$ tub, welche nicht effektiv an Tubulin bindet, transfiziert waren, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 3-14 D, erste Reihe). Wild-Typ GFP-RITA war deutlich mit der mitotischen Spindel in der Metaphase assoziiert (Abbildung 3-14 A, erste Reihe) und mit der Zentralspindel in der

Anaphase (Abbildung 3-14 A, zweite Reihe). Dagegen war GFP-RITA  $\Delta$ tub diffus im Zytoplasma und nur schwach an der Metaphase Spindel oder Zentralspindel in der Anaphase lokalisiert (Abbildung 3-14 A, dritte und vierte Reihe).



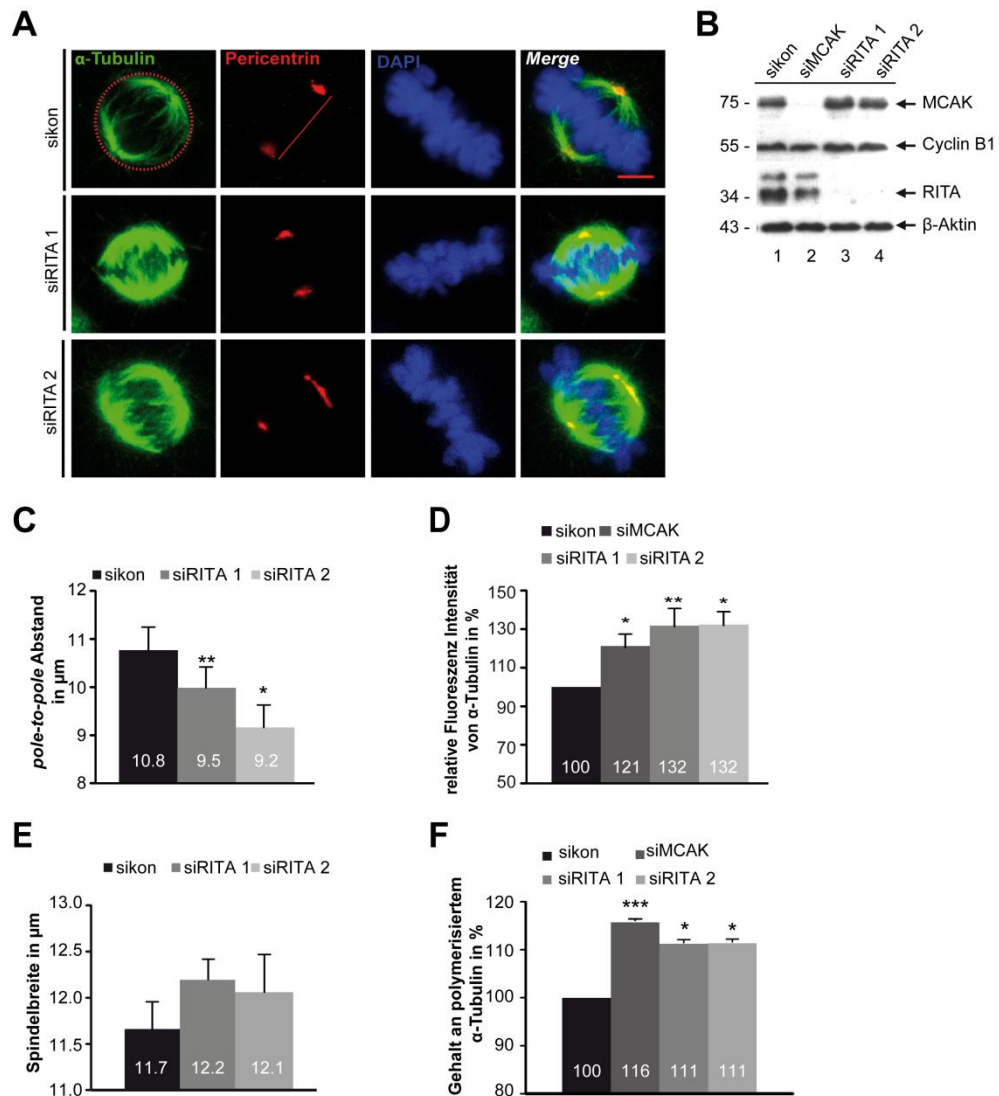
**Abbildung 3-14:** Wildtyp RITA aber nicht RITA  $\Delta$ tub reduziert die mitotischen Defekte nach Depletion. (A) HeLa Zellen wurden mit siRITA 2 transfiziert und anschließend mit 0,5  $\mu$ g Wild-Typ GFP-RITA (RITA wt, aa 1-269) oder GFP-RITA  $\Delta$ tub (aa 1-257) transfiziert. 24 h später wurden die Zellen für konfokale Immunfluoreszenzmikroskopie mit Pericentrin,  $\alpha$ -Tubulin und DNA gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Weiße Pfeile zeigen *congression* oder *segregation* Defekte. Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m. (B und C) Auswertung der *congression* (B) und *segregation* (C) Defekte (n=180 mitotischen Zellen pro Bedingung). Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. \* p<0,05, \*\* p<0,01. (D) Kontroll Western-Blot Analyse der HeLa-Zellen aus (A).  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Durch das Einbringen von Wild-Typ RITA konnten die mitotischen Defekte wieder reduziert werden (Abbildung 3-14 B und C). Das Einbringen der RITA  $\Delta$ tub-Mutante konnte die mitotischen Defekte dagegen nicht reduzieren, sondern erhöhte sie im Vergleich zur siRNA gegen RITA sogar noch etwas (Abbildung 3-14 B und C). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Tubulin-Bindung von RITA funktionell ist und die Störung dieser Tubulin-Bindung von RITA mit den MTs zu den mitotischen Defekten beitragen kann.

### 3.3 RITA und MT-Dynamik

#### 3.3.1 Zellen ohne RITA besitzen ein erhöhtes Level an polymerisiertem Tubulin und verkürzte Spindeln

Um zu sehen, welchen Effekt RITA in Bezug auf die MT-Funktionen hat, wurde RITA in HeLa Zellen depletiert und anschließend  $\alpha$ -Tubulin gefärbt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde dann die Intensität des  $\alpha$ -Tubulins analysiert und somit auf den MT-Polymergehalt geschlossen. Beide siRNAs gegen RITA zeigten einen effizienten *knock down* (Abbildung 3-15 B, Reihe 3). Zudem wiesen Zellen ohne RITA starre Spindeln mit einer hohen Intensität/Dichte von MTs auf (Abbildung 3-15 B, Reihe 2 und 3).



**Abbildung 3-15:** Erhöhtes polymerisiertes Tubulin-Level und verkürzter Pol-Abstand in Zellen ohne RITA. (A) HeLa Zellen wurden mit sikon, siRITA 1 und siRITA 2 transfiziert und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. MT Intensität und der *pole-to-pole* Abstand wurden gemessen (n = 100 mitotische Spindeln pro Bedingung). Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Kontroll Western Blot der siRNA Transfektion. (C) und (D) Quantifizierung der MT Intensität und des *pole-to-pole* Abstands. Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. MCAK diente als Positivkontrolle. (E) Quantifizierung der Spindelbreite in (A). (F) HeLa Zellen wie in (A) behandelt und mit Nocodazol

---

behandelt. MT Polymer-Gehalt von mitotischen *shake-off* Zellen wurde im FACS gemessen und MCAK diente als Positivkontrolle. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

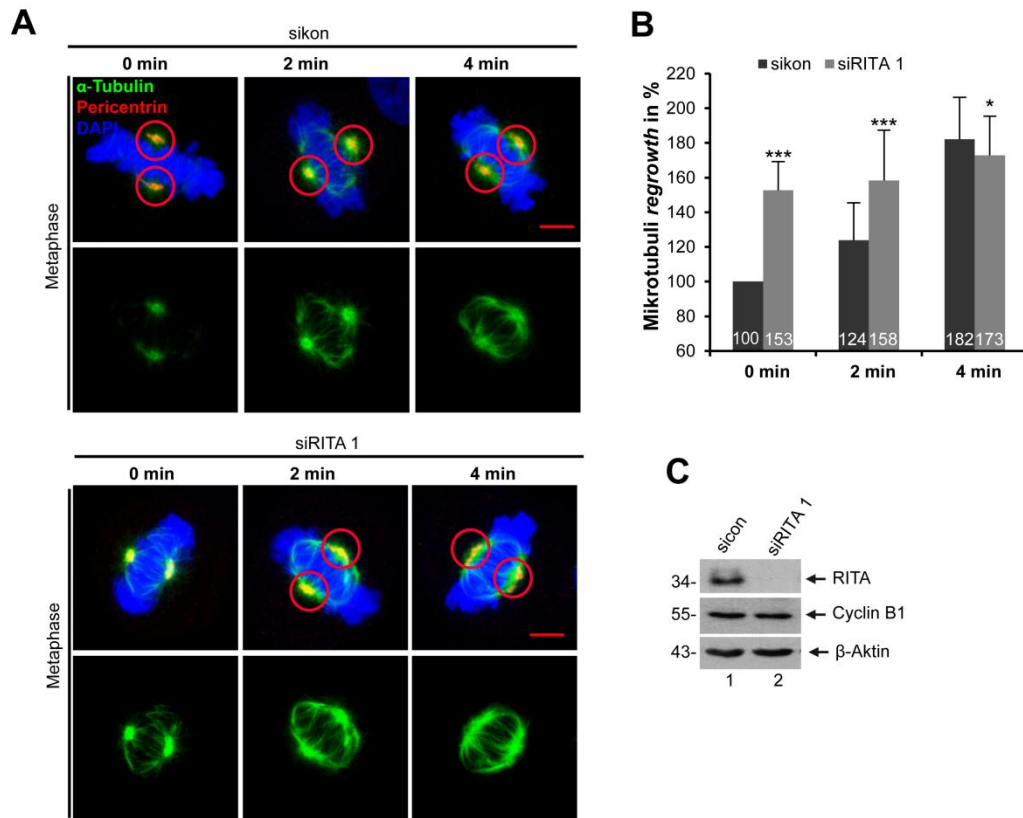
Die erhöhte MT Intensität konnte zusätzlich mittels FACS Analyse bestätigt werden, indem der Gehalt an polymerisiertem Tubulin in HeLa Zellen gemessen wurde (Abbildung 3-15 F). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der Zelllinie U2OS beobachtet (Daten nicht gezeigt).

---

### 3.3.2 RITA ist in die MT Dynamik involviert

---

Als nächstes sollte untersucht werden, ob RITA eine Rolle in der Modulation der MT Dynamik spielt. Dazu wurden mitotische HeLa Zellen mit oder ohne RITA (Abbildung 3-16 C) für eine Stunde auf Eis gestellt, um alle MTs zu depolymerisieren und dann anschließend wieder in warmes Medium für 2 und 4 min zur Re-Polymerisation der MTs gegeben (Ritter et al., 2015). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit  $\alpha$ -Tubulin gefärbt um die Intensität der MTs um das Mikrotubuli-Organisationszentrum (*microtubule-organizing center* MTOC) gemessen. In Zellen mit RITA wurden die MTs nach der Behandlung mit Kälte schnell depolymerisiert (Abbildung 3-16 A, obere Reihe, 0 min, und B), Zellen ohne RITA hingegen wiesen um circa 50 % mehr polymerisierte MTs nach der Kälte-Behandlung auf (Abbildung 3-16 A, untere Reihe, 0 min, und B). Nach der Zugabe von warmem Medium repolymerisierten Kontrollzellen die MTs (Abbildung 3-16 A, obere Reihe, 2 min und 4 min, und B). In Zellen ohne RITA schienen die MTs viel langsamer zu repolymerisieren während der 4 min Phase im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 3-16 A, untere Reihe, 4 min, und B).

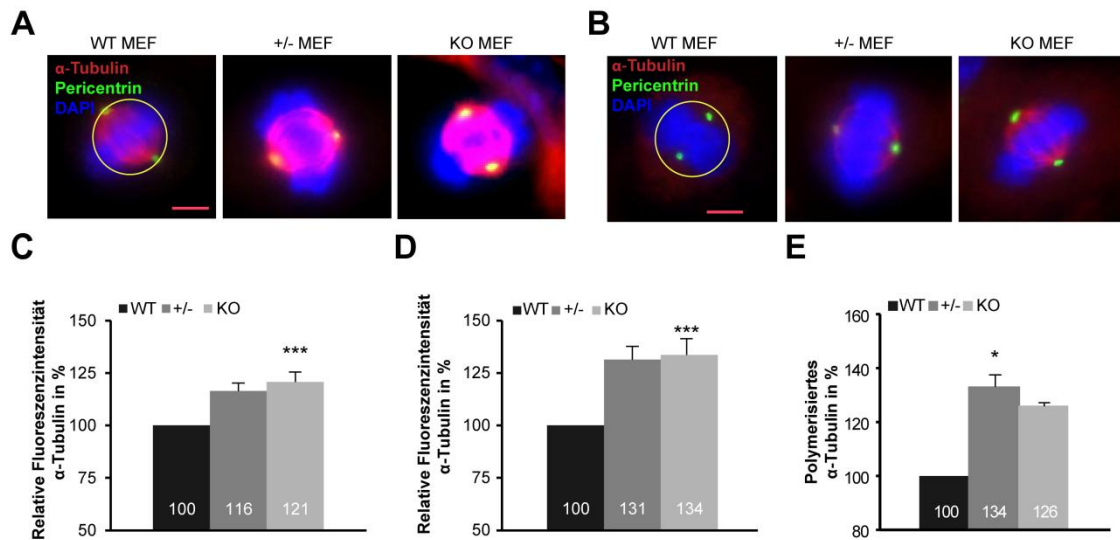


**Abbildung 3-16:** Reduzierte MT Dynamik in Zellen ohne RITA. (A) HeLa Zellen wurden mit siRNA behandelt. Zellen wurden für 1 h auf Eis gestellt, in warmes Medium für 2 und 4 min gegeben und mit  $\alpha$ -Tubulin, Pericentrin und DAPI gefärbt. Tubulin *regrowth* in Metaphase Zellen wurde analysiert (n = 30 Metaphase Zellen je Bedingung). Beispiele sind gezeigt und Kreise indizieren die den gemessenen Bereich. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Auswertung der Tubulin *regrowth* Rate. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*p < 0,05, \*\*\*p < 0,001. (C) Kontroll Western Blot der siRNA Transfektion.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Dieses Ergebnis zeigt, dass RITA eine Rolle in der Modulation der MT Dynamik spielt und dass Zellen ohne RITA eine langsamere und gestörte MT Dynamik aufweisen.

### 3.3.3 Fibroblasten aus RITA KO Mäusen zeigen verändertes MT-Verhalten

Die Funktion von RITA *in vivo* in Bezug auf das MT-Verhalten wurde zusätzlich in den MEFs untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Intensität der MTs in den Metaphase-Zellen höher bei RITA KO und RITA +/- MEFs im Vergleich zu RITA Wildtyp-MEFs war (Abbildung 3-17 A und C). Bei der Kaltbehandlung war die erhöhte MT Intensität sogar noch ausgeprägter in den RITA KO MEFs als in den Wildtyp-MEFs (Abbildung 3-17 B und D). Im Einklang mit diesen Beobachtungen war der Gehalt von polymerisiertem  $\alpha$ -Tubulin in der Durchflusszytometrie-Messung ebenfalls höher in RITA +/- und RITA KO MEFs als in den Wildtyp-MEFs (Abbildung 3-17 E).



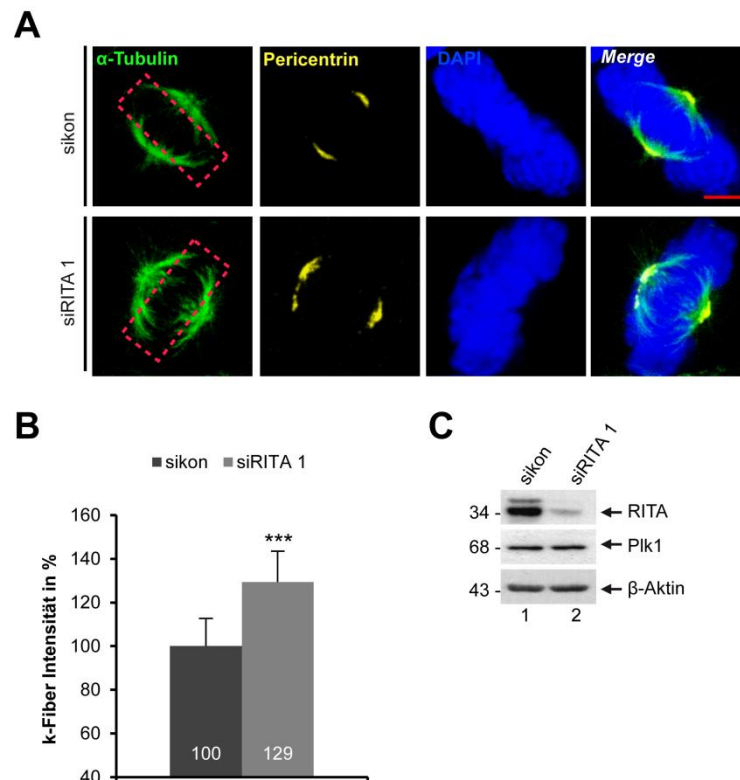
**Abbildung 3-17:** Erhöhte MT-Dichte und deregulierte MT-Dynamik in RITA KO MEFs. (A) MEFs wurden mit angegebenen Antikörpern für die Mikroskopie gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (C) Die Intensität der MTs in (A) wurde wie angegeben gemessen. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2, 40 Metaphasen je Bedingung) und als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. \*\*\* p < 0,001. (B) MEFs wurden kalt behandelt für 1 h zur Depolymerisation der MTs und für die Mikroskopie gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (D) Die Intensität der verbleibenden MTs in (B) wurde wie angegeben gemessen. Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (n = 2, 30 Metaphasen je Bedingung) und sind als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. \*\*\* p < 0,001. (E) MEFs wurden gefärbt mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Tubulin und der MT-Polymergehalt wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Ergebnisse basieren auf zwei unabhängigen Experimenten und sind als Mittelwert  $\pm$ SEM dargestellt. \* p < 0,05.

Diese *in vivo* Daten bestätigen die gewonnen Erkenntnisse aus den Versuchen mit den Krebszelllinien und zeigen deutlich, dass RITA eine wichtige Rolle in der Modulation der MT-Dynamik spielt.

### 3.3.4 Zellen ohne RITA haben stabilere Kinetochor-MTs

Um die Stabilität der Kinetochor-MTs genauer zu untersuchen, wurden RITA depletierte Zellen für 12 min auf Eis gehalten (Abbildung 3-18 A), um alle MTs außer die Kinetochor-MTs zu depolymerisieren (Meunier and Vernos, 2011). Auch hier zeigte sich, dass Zellen ohne RITA im Vergleich zu Kontrollzellen stabilere Kinetochor-MTs aufwiesen (Abbildung 3-18 A, Reihe 1). Die Messung der Fluoreszenzintensität der Kinetochor-MTs ergab, dass diese in Zellen um circa 29 % erhöht war im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 3-18 B).





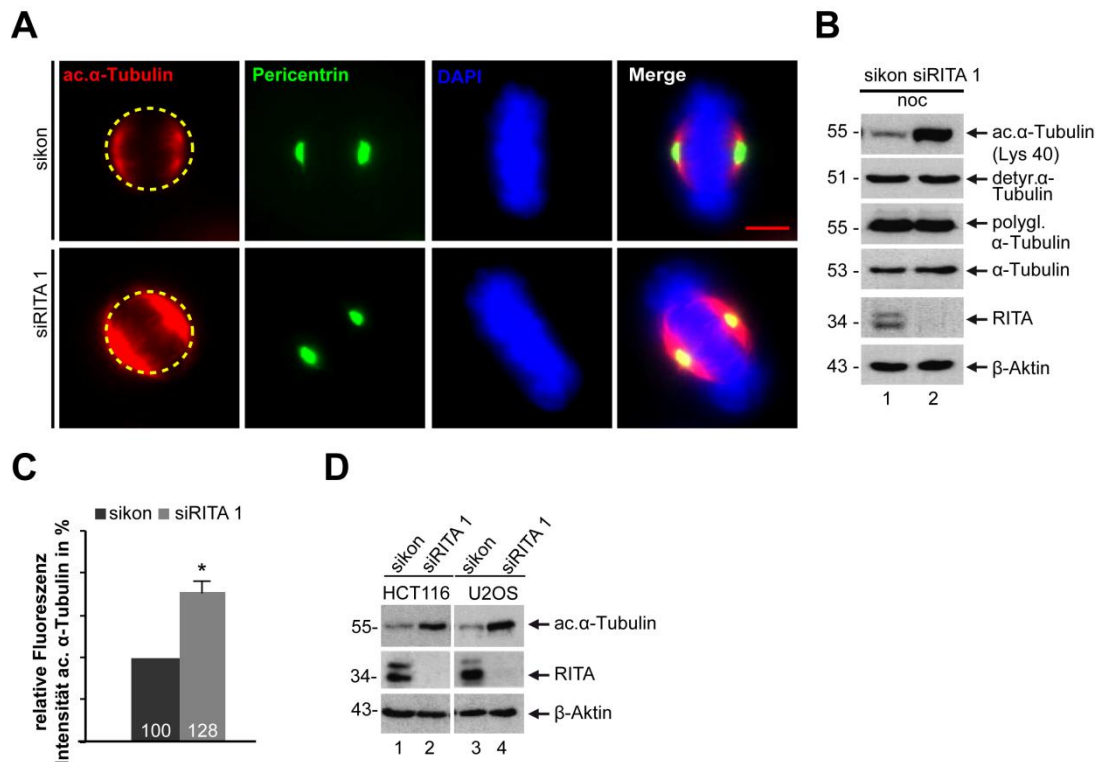
**Abbildung 3-18:** Erhöhte Stabilität der k-MTs. (A) HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen RITA behandelt und für 12 min auf Eis gestellt um alle nicht-k-MTs zu depolymerisieren. Immunfluoreszenzfärbungen mit angegebenen Antikörpern wurden durchgeführt. Maßstab: 5  $\mu$ m. Rote Box indiziert die Area in denen die Intensität der Kinetochor-MTs gemessen wurde. (B) Auswertung der Kinetochor-MTs Intensität in Metaphase Zellen (n = 100 k-MTs pro Bedingung). Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\*p < 0.001. (C) Kontroll Western Blot der siRNA Transfektion.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Anhand dieser Daten konnte erneut gezeigt werden, dass die Zellen ohne RITA eine erhöhte Stabilität der MTs besitzen und dass diese Zellen resistenter gegen die durch Kälte induzierte Depolymerisation sind.

### 3.3.5 Depletion von RITA erhöht den Gehalt an acetyliertem $\alpha$ -Tubulin

Posttranslationale Modifikationen von  $\alpha$ -Tubulin, wie Acetylierung, Detyrosinierung und Polyglutamylierung, sind wichtig, um die Stabilität und Dynamik von MTs (Janke and Chloë Bulinski, 2011) zu regulieren. Deshalb sollte untersucht werden, ob RITA an der Regulation dieser Modifikationen beteiligt ist. Dazu wurden HeLa-Zellen ohne RITA in die Prometaphase synchronisiert und Zelllysate für Western Blot Analysen hergestellt. Interessanterweise war das Level an acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin deutlich höher in Zellen mit siRNA gegen RITA als in Kontrollzellen (Abbildung 3-19 B, Spalte 2, Reihe 1), während die

Mengen an detyrosiniertem und polyglutamyliertem  $\alpha$ -Tubulin vergleichbar waren (Abbildung 3-19 B, Reihe 2 und 3).



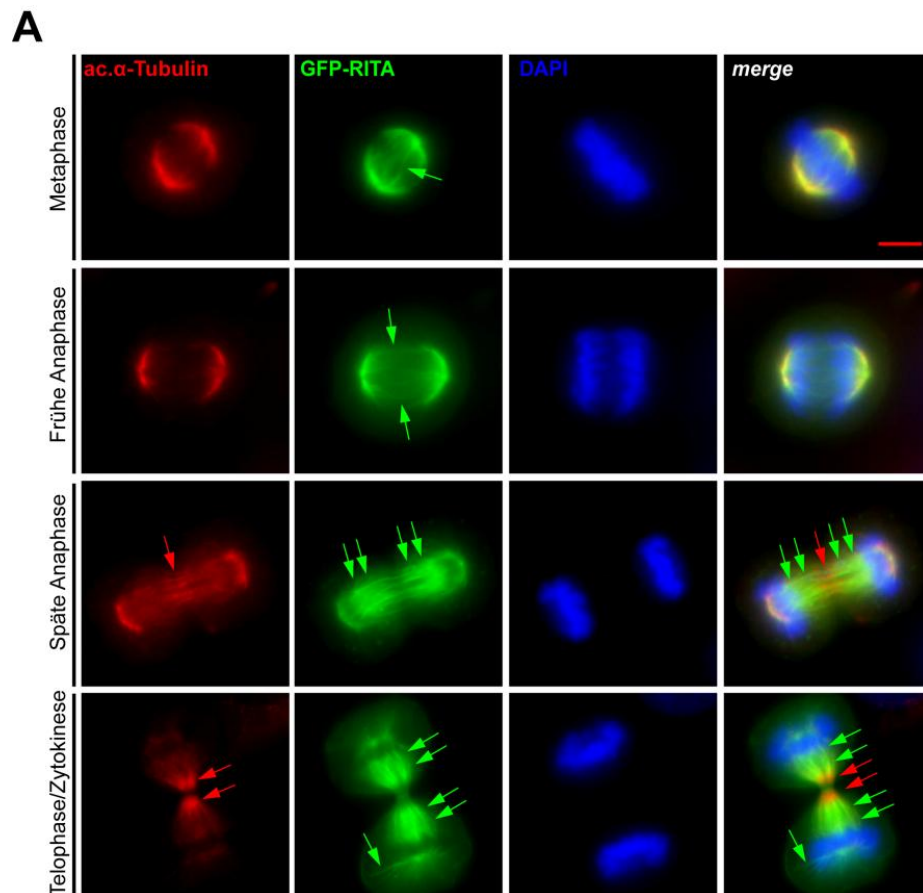
**Abbildung 3-19:** Erhöhtes acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin-Level in Zellen ohne RITA. (A) HeLa Zellen wurden mit siRNA gegen RITA (siRITA 1) oder Kontroll-siRNA siRNA (sikon) behandelt und mit den angegebenen Antikörpern für Immunfluoreszenzanalysen gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) HeLa Zellen behandelt wie in (A) wurden in die Prometaphase synchronisiert und Zelllysate für Western Blot Analysen mit den gezeigten Antikörpern erstellt.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (C) Die Intensität von acetylierten  $\alpha$ -Tubulin in Metaphase Zellen wurde gemessen (n = 40 Metaphase Zellen pro Bedingung). Die Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*p < 0,05. (D) HCT116 und U2OS wurden mit siRNA behandelt und synchronisiert in die Prometaphase für Western Blot Analysen.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Darüber hinaus war das Proteinlevel an  $\alpha$ -Tubulin nicht abhängig von RITA (Abbildung 3-19 B, Reihe 4). Dies deutet darauf hin, dass RITA keinen Einfluss auf die Transkription von  $\alpha$ -Tubulin hat. Nach Depletion von RITA, konnte das erhöhte acetylierte  $\alpha$ -Tubulin-Level auch in HCT116 (Abbildung 3-19 D, Spalte 2) und in U2OS Zellen beobachtet werden (Abbildung 3-19 D, Spalte 4). Zudem war die Fluoreszenzintensität des acetylierten  $\alpha$ -Tubulins um circa 28 % erhöht in RITA depletierten Metaphase Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 3-19 A). Diese Daten zeigen deutlich, dass in Zellen ohne RITA die Acetylierung des Lysin-40 von  $\alpha$ -Tubulin in der Mitose begünstigt wird.



### 3.3.6 RITA kolokalisiert mit acetyliertem $\alpha$ -Tubulin

Um eine mögliche Assoziation von RITA mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin zu zeigen, wurden HeLa Zellen mit GFP-RITA transfiziert und anschließend für Immunfluoreszenzanalysen mit einem Antikörper gegen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin gefärbt. RITA kolokalisierte mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin in der mitotischen Spindel während der Metaphase (Abbildung 3-20 A). RITA konnte zudem an den interpolaren anti-parallelen MTs gefunden werden (Abbildung 3-20 A, Reihe 1, GFP-RITA, grüne Pfeile), bis hin zur Anaphase (Abbildung 3-20 A, Reihe 2, GFP-RITA, grüne Pfeile), bis hin zur Anaphase (Abbildung 3-20 A, Reihe 2, GFP-RITA, grüne Pfeile).



**Abbildung 3-20:** RITA kolokalisiert teils mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin. (A) HeLa Zellen wurden mit GFP-RITA transfiziert und für Immunfluoreszenz-Mikroskopie gefärbt. Verschiedene mitotische Phasen sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m.

Im Gegensatz dazu war das Signal von acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin schwächer an diesen MTs. Zusammen mit seiner favorisierten Lokalisation an den interpolaren MTs war RITA wieder bevorzugt an beiden distalen Regionen der Zentralspindel in der Nähe der getrennten Chromosomen in der späten Anaphase zusehen (Abbildung 3-20 A, Reihe 3, GFP-RITA, grüne Pfeile), wie auch schon in Abbildung 1-3 deutlich war. Acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin war

---

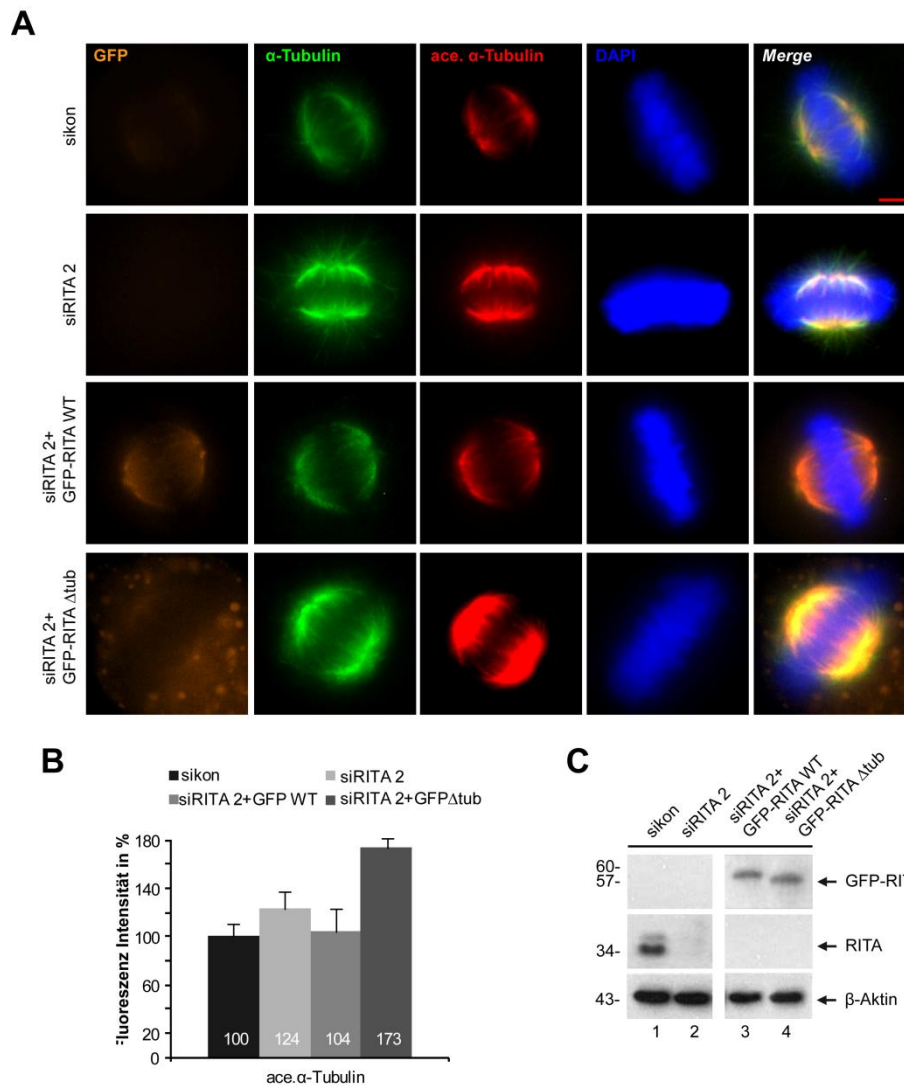
hauptsächlich in der mittleren Zone der Anaphase Spindel fokussiert, in der stabile MTs für die Trennung der Tochter-Chromatide erforderlich sind (Abbildung 3-20 A, Reihe 3, acetyliertes Tubulin, rote Pfeile). In der Telophase/Zytokinese, während RITA an der Zentralspindel und *midbody* verbleibt, ist acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin vermehrt in der Nähe des *midbody* lokalisiert (Abbildung 3-20 A, Reihe 4, GFP-RITA und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin-Färbung, rote und grüne Pfeile). RITA und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin überlappen an den mitotischen MTs und weisen spezifische räumliche Lokalisationen innerhalb der mitotischen Spindel während der Mitose auf. Somit ist zu vermuten, dass die Anwesenheit von RITA die Lysin-40 Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin innerhalb MTs modulieren kann.

---

### **3.3.7 Rescue mit Wildtyp-RITA aber nicht RITA $\Delta$ tub verringert die Menge an acetyliertem $\alpha$ -Tubulin**

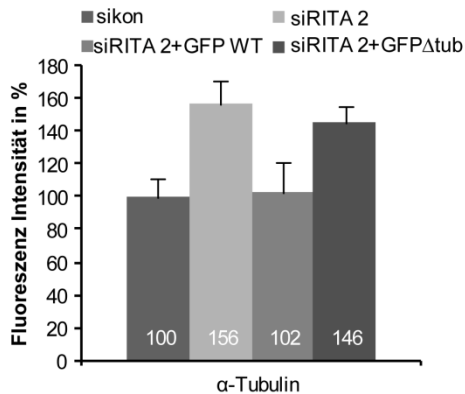
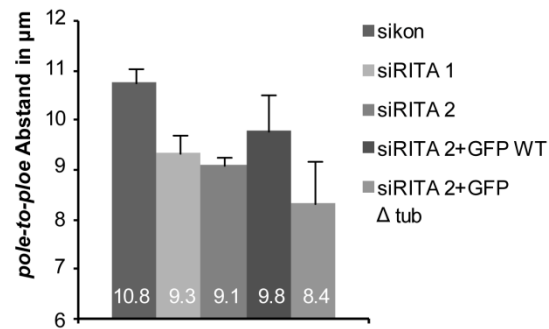
---

RITA besitzt eine Tubulin-Bindungsdomäne am C-Terminus (Wacker et al., 2011) (Abbildung 3-4 B). Mittels weiteren Versuchen sollte herausgestellt werden, ob diese Domäne für das erhöhte Level von acetyliertem Tubulin verantwortlich ist. Dazu wurden HeLa Zellen mit der siRNA 2, welche gegen die 3'-untranslatierte Region gerichtet ist, behandelt und anschließend mit GFP-RITA Wild-Typ (aa 1-269) oder GFP-RITA  $\Delta$ tub (aa 1-257) (Abbildung 3-21 C) transfiziert. Zellen wurden mit den Antikörpern gegen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin,  $\alpha$ -Tubulin und die DNA für Fluoreszenzmikroskopie gefärbt (Abbildung 3-21 A). Wild-Typ RITA war mit der Metaphase Spindel assoziiert (Abbildung 3-21 A, Reihe 3, GFP-RITA), GFP-RITA  $\Delta$ tub dagegen zeigte keine richtige Lokalisation an den MT-Strukturen und war mehr diffus im Zytoplasma verteilt (Abbildung 3-21 A, Reihe 4, GFP-RITA  $\Delta$ tub). Die Analyse der Fluoreszenzintensität von acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin ergab, dass Wild-Typ RITA das Level an acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin wieder auf das Level der Kontrollzellen reduzieren konnte (Abbildung 3-21 A und B, Reihe 3, acetyliertes Tubulin).



**Abbildung 3-21** Wild-Type RITA, nicht aber RITA  $\Delta$ tub reduziert das Level an acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin. (A) HeLa Zellen wurden zuerst mit siRNA behandelt und dann anschließend wurde 0.5  $\mu$ g von Wild-Typ GFP-RITA (aa 1-269) oder GFP-RITA  $\Delta$ tub (aa1-257), wieder eingebracht. 24 h später wurden die Zellen mit den angegebenen Antikörpern für Immunfluoreszenzanalysen gefärbt. Beispiel-Bilder sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m (B). Auswertung der Intensität von acetylierten  $\alpha$ -Tubulin in Metaphase Zellen (n=180 mitotische Zellen je Bedingung). Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$ SD dargestellt, \*\*\*p < 0,001. (C) Kontroll Western Blot.  $\beta$ -Aktin dient als Ladekontrolle.

Im Gegensatz dazu, wurde durch die Überexpression von RITA  $\Delta$ tub mehr acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin (173 %) im Vergleich zu den RITA depletierten Zellen (124 %) beobachtet (Abbildung 3-21 A, Reihe 4, acetyliertes Tubulin), möglicherweise aufgrund seiner starken dominant-negativ Wirkung. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch der Gehalt an  $\alpha$ -Tubulin und der Abstand der Pole nach wieder Einbringen von endogenem Level an GFP-RITA den zuvor mit siRNA beobachteten Phänotyp beinahe umkehren konnte (Abbildung 3-22 A und B). Die Tubulin-Mutante dagegen verstärkte den Effekt der siRNA (Abbildung 3-22 A und B).

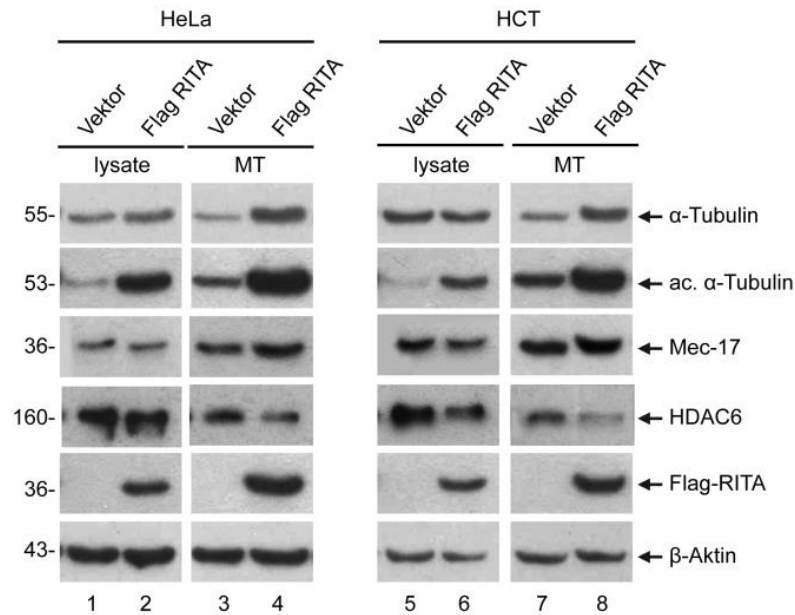
**A****B**

**Abbildung 3-22:** Wild-Type RITA, nicht aber RITA  $\Delta$ tub reduziert das Level an  $\alpha$ -Tubulin und korrigieren den *pole-to-pole* Abstand. (A) HeLa Zellen wurden wie in Abbildung 3-21 behandelt und die Intensität von  $\alpha$ -Tubulin gemessen. (B) wie in (A), der *pole-to-pole* Abstand wurden gemessen. Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$ SD dargestellt.

Die Ergebnisse implizieren, dass RITA an der Modulation von der  $\alpha$ -Tubulin-Acetylierung beteiligt ist. Für die Modulation der Acetylierung an Lysin 40 in  $\alpha$ -Tubulin ist die Tubulin-Bindungsdomäne in RITA erforderlich.

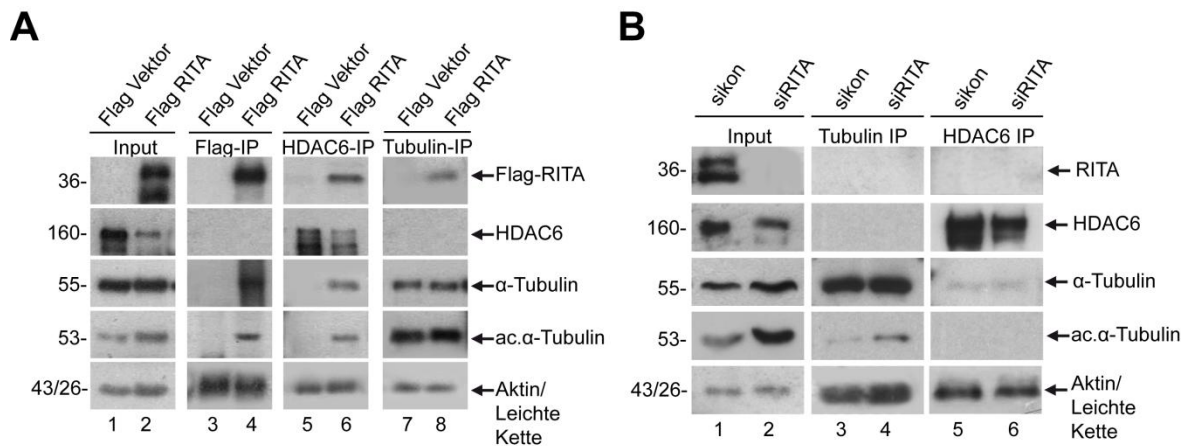
### 3.3.8 RITA beeinflusst die Assoziation von HDAC6 und Mec-17 mit $\alpha$ -Tubulin

Die Lysin-40 Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin wird hauptsächlich von der Acetyltransferase Mec-17 (auch genannt  $\alpha$ TAT1) (Akella et al., 2010; Shida et al., 2010) und den Deacetylasen HDAC6 und SIRT2 reguliert (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; North et al., 2003). Um zu prüfen, ob Mec-17 und HDAC6 von RITA beeinflusst werden, wurden HeLa und HCT116 Zellen mit Flag-RITA transfiziert und anschließend synchronisiert um mitotische Zellen zu erhalten. Dann erfolgte eine MT-Fraktionierung (Nguyen et al., 1999) und Western Blot Analysen. Zellen mit endogenem RITA zeigten moderate Proteinlevel an acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin, Mec-17 und HDAC6 im Zelllysate und in den MT-Fractionen (Abbildung 3-23 A, Reihe 1, 3, 5 und 7). Dagegen zeigten Zellen mit exogenem RITA ein erhöhtes Proteinlevel an acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin und Mec-17 im Zelllysate sowie in der MT-Fraktion (Abbildung 3-23 A, Reihe 2, 4, 6 und 8, acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin und Mec-17). HDAC6 war dagegen deutlich erniedrigt in der MT-Fraktion bei Zellen mit exogenem RITA (Abbildung 3-23 A, Reihe 2, 4, 6 und 8, HDAC6), was darauf schließen lässt, dass in Anwesenheit von exogenem RITA die Assoziation von HDAC6 mit den MTs gestört ist.

**A**

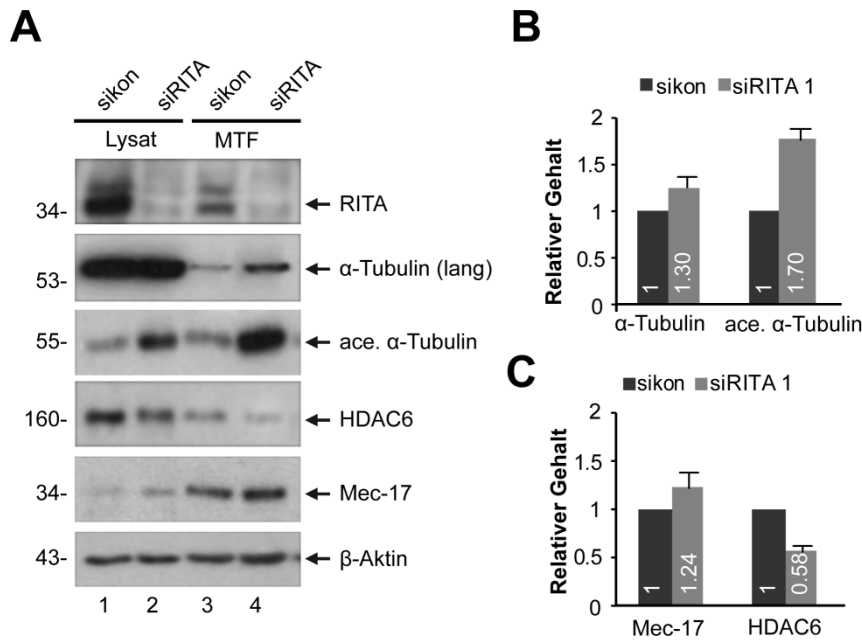
**Abbildung 3-23:** Weniger MT assoziiertes HDAC6 in RITA überexprimierenden Zellen. (A) Lysate der MT-Fraktionierung von HeLa und HCT116 Zellen welche RITA überexprimieren und in die Prometaphase synchronisiert waren, wurden mittels Western Blot analysiert.  $\beta$ -Aktin dient als Ladekontrolle.

Um eine mögliche direkte Assoziation zwischen RITA und HDAC6 zu überprüfen, wurden HCT116 Zellen mit Flag-RITA transfiziert und in die Mitose synchronisiert. Anschließend wurden Immunopräzipitationen durchgeführt. HDAC6 konnte in einem Komplex mit Flag-RITA und  $\alpha$ -Tubulin aus mitotischen Zellen immunopräzipitiert werden (Abbildung 3-24 A, Reihe 6). HDAC6 konnte nicht in dem Flag-RITA oder  $\alpha$ -Tubulin Präzipitat gefunden werden (Abbildung 3-24 A, Reihe 4 und 8), möglicherweise durch das geringe endogene Level an HDAC6 in diesen Zellen. Die Bindung zwischen RITA und  $\alpha$ -Tubulin konnte erneut in beiden Präzipitaten gezeigt werden (Abbildung 3-24 A, Reihe 4 und 8). Interessanterweise wurde durch die Depletion von RITA die Komplexbildung von HDAC6 und  $\alpha$ -Tubulin (Abbildung 3-24 B, Reihe 6) gestört war, was darauf schließen lässt, dass die Anwesenheit von RITA die Bildung eines Komplexes aus HDAC6 und Tubulin fördert. Zudem konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von RITA und die Depletion von RITA zu einer Reduktion des HDAC6 Proteinlevel in Zelllysaten führt (Abbildung 3-24 A und B, Reihe 2, HDAC6).



**Abbildung 3-24:** RITA fördert die Bindung von HDAC6 mit  $\alpha$ -Tubulin. (A) HCT116 Zellen wurden mit Flag-Vektor oder Flag-RITA transfiziert, mit Nocodazol synchronisiert und 1 h in frisches Medium entlassen. Lysate wurden für Immunpräzipitationen (IP) mit Flag-, HDAC6- und  $\alpha$ -Tubulin Antikörper erstellt. IPs wurden mittels Western Blot analysiert.  $\beta$ -Aktin und leichte Kette dienten als Ladekontrolle. (B) HeLa Zellen wurden mit siRNA und siRITA behandelt, synchronisiert und Lysate wurden für Immunpräzipitationen mit HDAC6- und  $\alpha$ -Tubulin Antikörper erstellt. IPs wurden mittels Western Blot analysiert.  $\beta$ -Aktin und leichte Kette dienten als Ladekontrolle.

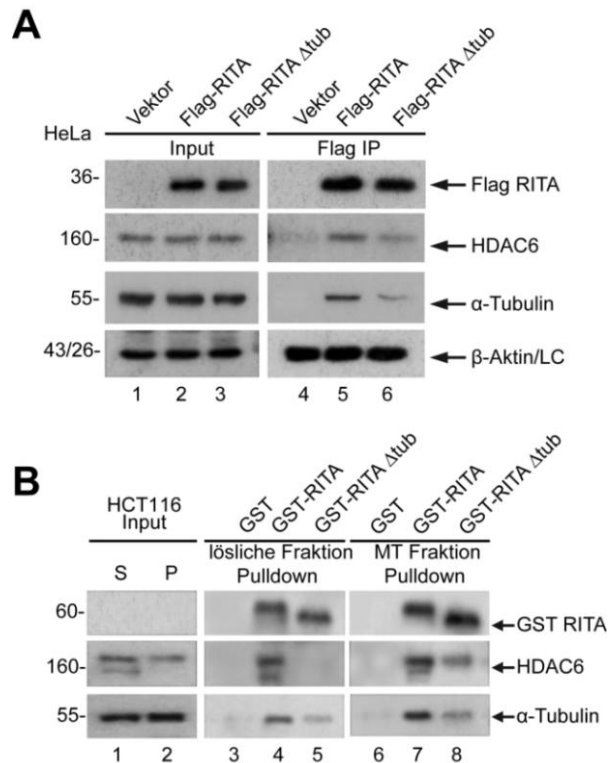
Des Weiteren sollte analysiert werden, wie die Assoziation von Mec-17 und HDAC6 mit Tubulin in Zellen ohne RITA ist. Dazu wurden HeLa Zellen mit siRNA gegen RITA transfiziert, in die Prometaphase synchronisiert und anschließend eine MT-Fraktionierung durchgeführt. Interessanterweise war das Proteinlevel an HDAC6 im Zelllysate erneut geringer und in der MT-Fraktion war dieser Unterschied viel prägnanter (Abbildung 3-25 A, Reihe 5, Spalte 2 und 4, Abbildung 3-25 C). Zudem konnte eine moderate Erhöhung an Mec-17 in der MT-Fraktion von Zellen ohne RITA beobachtet werden (Abbildung 3-25 A, Reihe 4, Spalte 2 und 4, Abbildung 3-25 C). Das Level an  $\alpha$ -Tubulin war vergleichbar in den Zelllysaten (Abbildung 3-25 A, Reihe 2, Spalte 1 und 2), dagegen war in der MT-Fraktion in Zellen ohne RITA im Vergleich zu Kontrollzellen das Level an  $\alpha$ -Tubulin erhöht (Abbildung 3-25 A, Reihe 2, Spalte 3 und 4, Abbildung 3-25 B). Diese Daten werden durch die FACS Analysen unterstützt, die zeigen, dass RITA depletierte Zellen ein erhöhtes Level an polymerisiertem  $\alpha$ -Tubulin aufweisen (Abbildung 3-15 F). Auch zeigte sich erneut eine Erhöhung an acetyliertem Tubulin in Zellen ohne RITA (Abbildung 3-25 A, Reihe 3, Spalte 3 und 4, Abbildung 3-25 B), wie schon bei den Immunfluoreszenz Analysen gezeigt werden konnte (Abbildung 3-19).



**Abbildung 3-25:** Depletion von RITA beeinflusst HDAC6 und Mec-17 an den MTs (A) Lysate von MT-Fractionen mitotischer HeLa Zellen welche mit sikon und siRITA 1 behandelt wurden. Western Blot Analyse mit angegebenen Antikörpern. (B) und (C) Quantifizierung des α-Tubulin, acetylierten α-Tubulin, HDAC6 und Mec-17 Signals aus (A), relativ zu β-Aktin. Ergebnisse stammen aus drei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert ± SEM dargestellt.

Diese Daten zeigen, dass in Abwesenheit von RITA mehr MTs acetyliert vorliegen und somit vermutlich stabiler sind, möglicherweise durch Störung der Assoziation von HDAC6 und Mec-17 mit Tubulin/MTs.

Um zu untersuchen, ob die Bindung von RITA an Tubulin für diese Komplexbildung notwendig ist (Abbildung 3-24 A, Spalte 6), wurden HeLa Zellen mit Flag-RITA und Flag-RITA Δtub transfiziert und Immunpräzipitationen mit Flag-Beads durchgeführt. Im Vergleich zu Zellen, welche mit Wild-Typ RITA (Abbildung 3-26 A, Spalte 5) transfiziert waren, wurde weniger HDAC6 aus Zellen mit Flag-RITA Δtub (Abbildung 3-26 A, Spalte 6) immunpräzipitiert. Diese konnte zudem zusätzlich in einem *Pulldown-Assay* mit löslichem oder polymerisierten MT Lysaten unter Verwendung von rekombinanten GST- RITA und seiner Mutante (Abbildung 3-26 B) bestätigt werden.



**Abbildung 3-26:** RITA fördert HDAC6/MT Komplexbildung *in vivo* und *in vitro*. (A) HeLa Zellen wurden mit Flag-RITA oder seiner Mutante transfiziert, synchronisiert und Immunpräzipitationen wurden durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot.  $\beta$ -Aktin und leichte Kette dienten als Ladekontrolle. (B) *Pulldown assay* mit rekombinanten GST-RITA oder GST-RITA  $\Delta$ tub aus mitotischen löslichen oder polymerisierten MT-Fraktionen von HCT116 Zellen. Western Blot Analyse. S: *soluble fraction* Lysat; P: *polymerized MT fraction* Lysat.

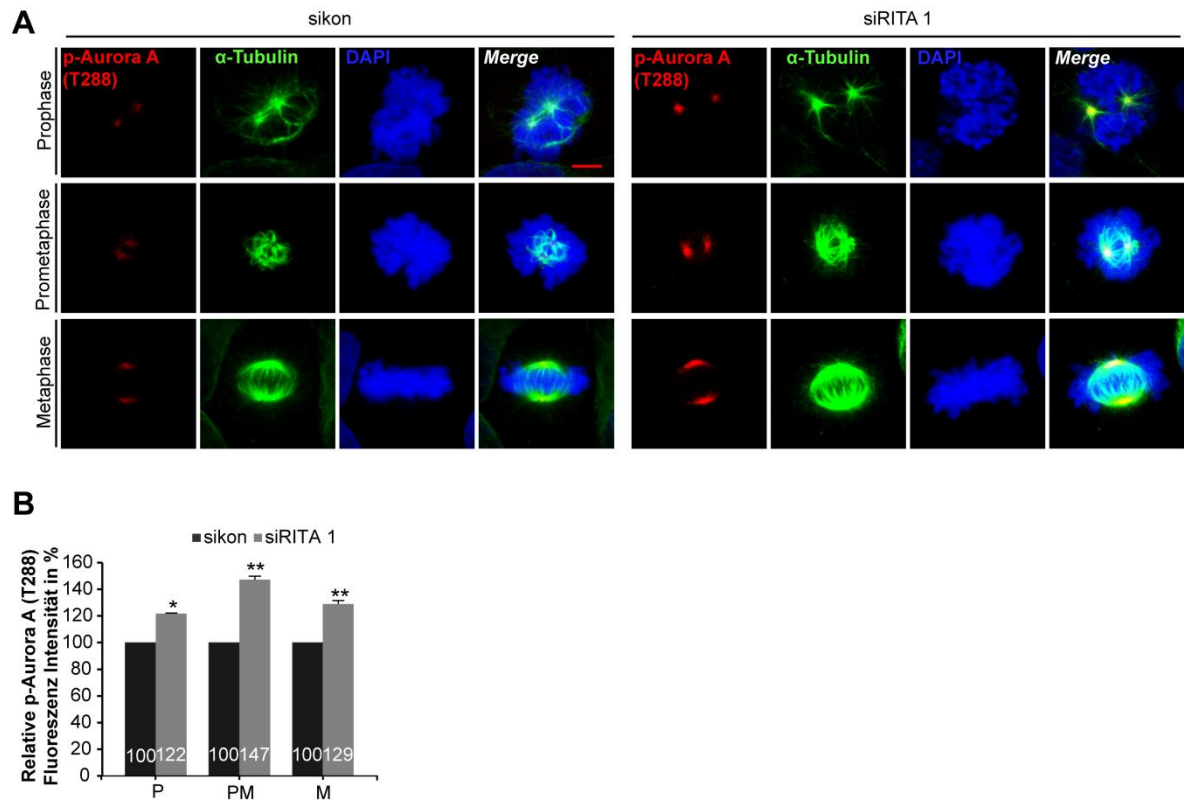
Diese Daten zeigen, dass die Anwesenheit von RITA die Assoziation von HDAC6 mit Tubulin begünstigt, die Abwesenheit jedoch die Bindung von Mec-17 mit MTs begünstigt.

### 3.3.9 Depletion von RITA erhöht das Level an aktiver Aurora A an den Spindel-Polen und Zentrosomen

Aurora A, eine Serin/Threonin Protein Kinase, reguliert den Spindelaufbau durch Kontrolle der Stabilität und Dynamik mitotischer MTs (Barr and Gergely, 2007). Um zu untersuchen, ob Aurora A mit den beobachteten MT Veränderungen assoziiert ist, wurden HeLa Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen die aktive Form von Aurora A (T288) in Anwesenheit oder Abwesenheit von RITA gefärbt. Es zeigte sich, dass das Phospho-Aurora A (T288) Signal in mitotischen HeLa-Zellen ohne RITA stark ausgeprägt war (Abbildung 3-27 A, Reihe 4, Spalte 1, siRITA). Um dieses beobachtete Phänomen genauer zu untersuchen, wurde das Fluoreszenz-Signal der aktiven Aurora A (T288) quantitativ ausgewertet. Im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen, war die Menge an phosphoryliertem

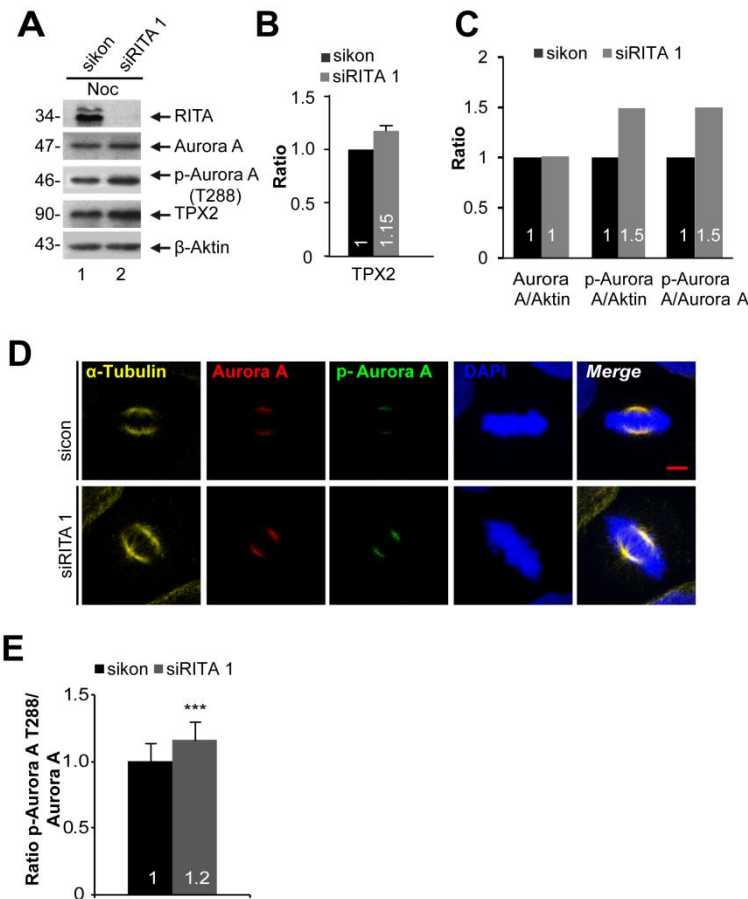


Aurora A deutlich an den Zentrosomen/Spindelpole von der Prophase bis zur Metaphase in Zellen ohne RITA erhöht (Abbildung 3-27, B).



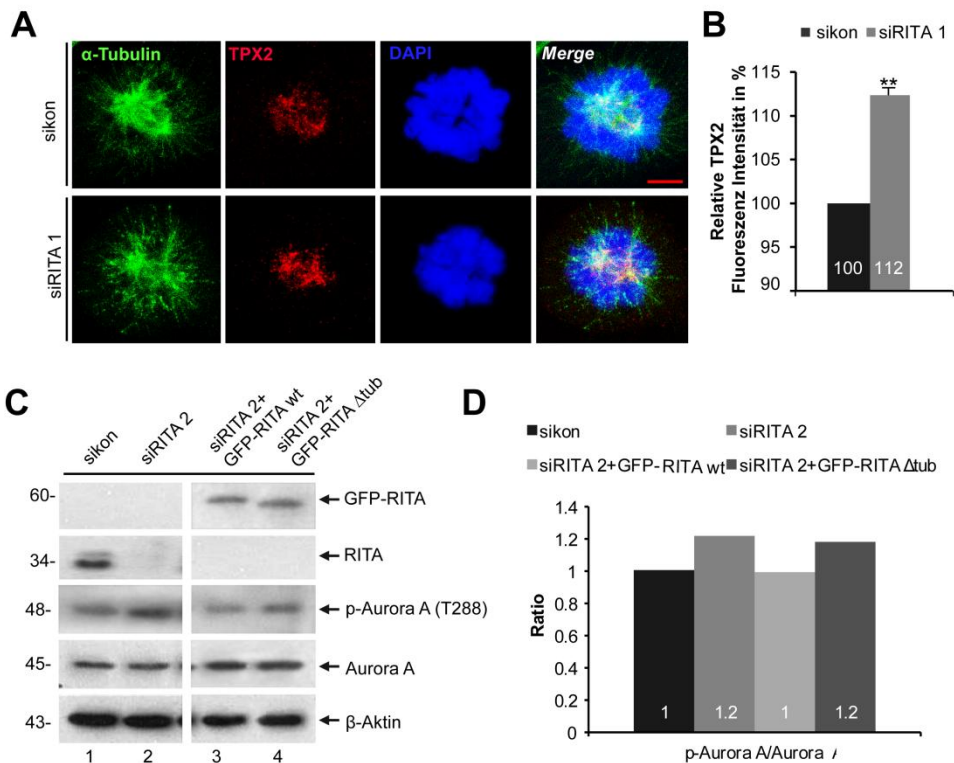
**Abbildung 3-27:** Erhöhte aktive Aurora A in Zellen ohne RITA. (A) HeLa Zellen wurden mit sikon und siRITA 1 transfiziert und mit den angegebenen Antikörpern gefärbt. Beispiele sind gezeigt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Die Intensität von p-Aurora A (T288) wurde in der Prophase, Prometaphase und Metaphase gemessen (n = 40 pro Bedingung). Ergebnisse stammen aus zwei (Prophase und Prometaphase) und aus drei (Metaphase) unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0.01.

In der Prophase stieg das Signal um 22 % an. Am deutlichsten zeigte sich dies in der Prometaphase, mit einem Anstieg um 47 %. In der Metaphase lag der Anstieg an aktiver Aurora noch bei circa 29 %. Auch Western Blot Analysen der Zelllysate zeigten ein erhöhtes Level an phospho-Aurora A (T288) in Prometaphase arretierten Zellen ohne RITA (Abbildung 3-28 A, Reihe 3), das Level an Aurora A war dagegen vergleichbar zwischen Zellen mit und ohne RITA (Abbildung 3-28 A, Reihe 2 und 1). Deutlich wurde der Unterschied bei der Bestimmung des Verhältnisses von phospho-Aurora A mit  $\beta$ -Aktin und phospho-Aurora A mit Aurora A (Abbildung 3-28 C, Reihe 3) aus der Western Blot Quantifizierung (Abbildung 3-28 A).



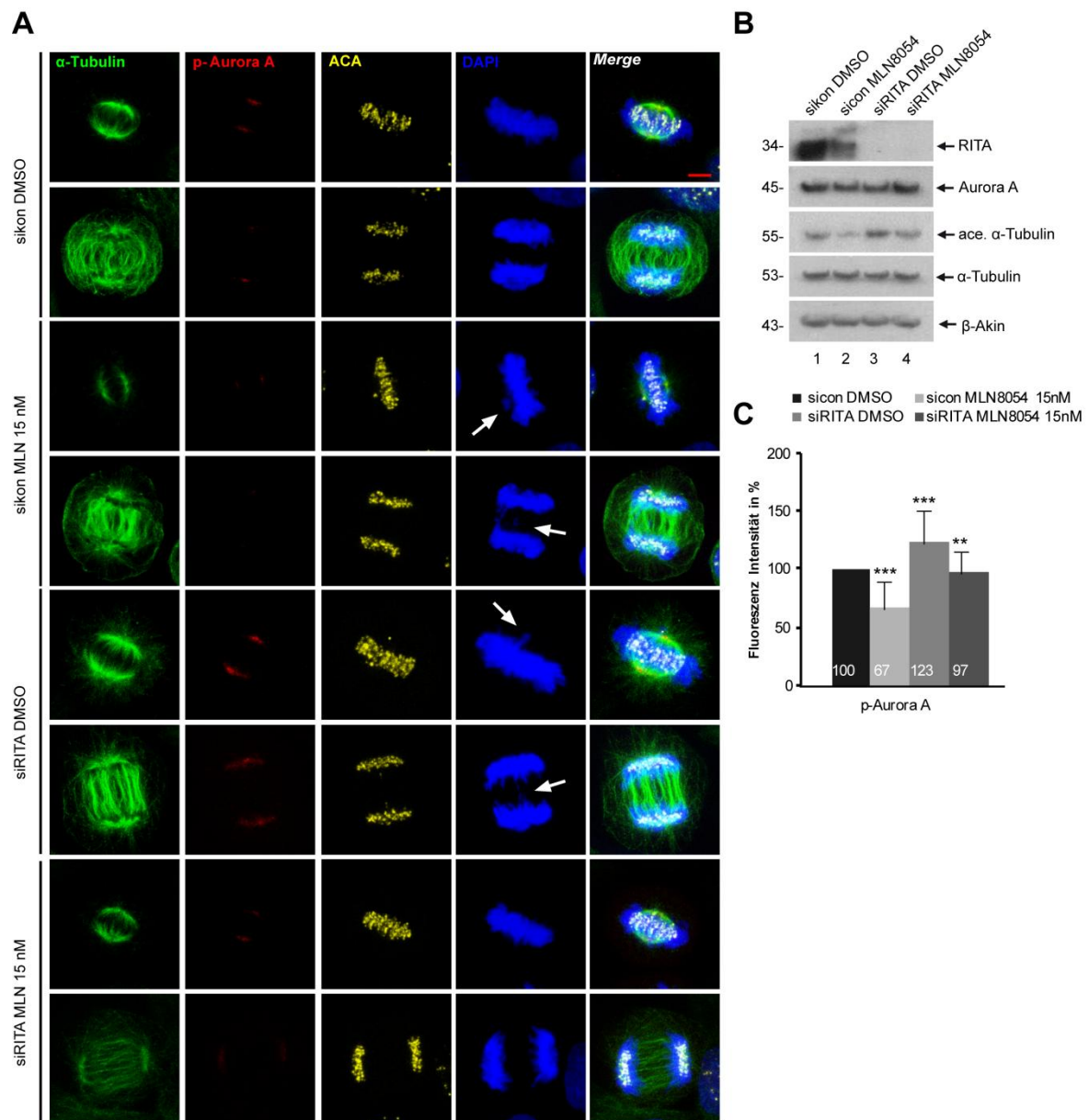
**Abbildung 3-28:** Depletion von RITA erhöht exklusiv die phosphorylierte Form von Aurora A, nicht aber Aurora A. (A) siRNA behandelte HeLa Zellen wurden synchronisiert und Western Blot Analysen durchgeführt.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (B) und (C) Quantifizierung des TPX2 Signals und des Verhältnisses von p-Aurora A/Aurora A. (D) siRNA behandelte HeLa Zellen wurden mit p-Aurora A und Aurora A für Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (E) Das Verhältnis von p-Aurora A/Aurora A wurde durch messen der Einzel-Intensitäten von p-Aurora A und Aurora A in Metaphase Zellen (n = 80 Zellen je Bedingung) bestimmt. Die Ergebnisse stammen von zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\*p < 0,001.

Auch die Quantifizierung der Immunfluoreszenzfärbung ergab ein erhöhtes Verhältnis/Ratio von p-Aurora A zu Aurora A in Metaphase Zellen ohne RITA (Abbildung 3-28 D und E). Interessanterweise war auch das Proteinlevel von TPX2, einem Aktivator von Aurora A in der Mitose, in Prometaphase Zellen moderat erhöht (Abbildung 3-28 A, Reihe 4, B). Dies konnte weiter durch Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden (Abbildung 3-29 A und B). Darüber hinaus konnte mit dem gleichen *rescue* Experiment, wie in Abbildung 3-14, durch das erneute Einbringen von Wildtyp-RITA, aber nicht RITA  $\Delta$ tub, das Verhältnis von p-Aurora A/Aurora A auf das Niveau der Zellen welche mit Kontroll-siRNA behandelt wurden hergestellt werden (Abbildung 3-29 C und D). Die Daten zeigen, dass die Abwesenheit von RITA zu einer Erhöhung an aktiver Aurora A in mitotischen Zellen führt.



**Abbildung 3-29:** Erhöhtes Level an TPX2 und rescue mit Wildtyp RITA, nicht aber RITA  $\Delta$ tub, reduzieren p-Aurora A. (A) HeLa Zellen mit sikön und siRITA wurden für Fluoreszenzmikroskopie mit den gezeigten Antikörpern gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Die Intensität des TPX2 Signal wurde in Prometaphase Zellen gemessen (n=50 Zellen pro Bedingung). Die Ergebnisse stammen von drei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*\*p < 0,001. (C) In HeLa Zellen wurde RITA depletiert und anschließend mit GFP-RITA oder GFP-RITA  $\Delta$ tub transfiziert. Lysate wurden mittels Western Blot analysiert. (D) Auswertung des Verhältnisses von p-Aurora A/Aurora A aus (C), normalisiert auf  $\beta$ -Aktin.

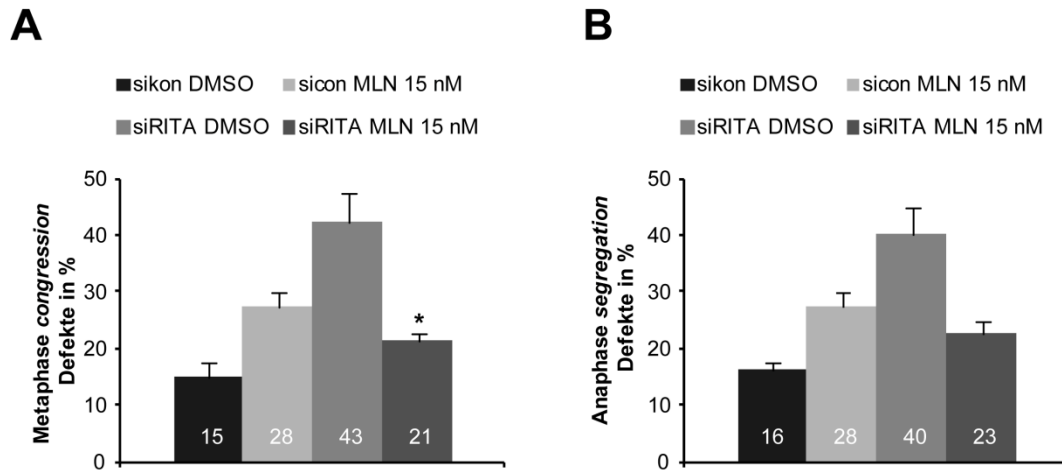
Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die erhöhte aktive Aurora A für die mitotischen Defekte mitverantwortlich ist. Dazu wurden HeLa Zellen mit siRNA gegen RITA transfiziert (Abbildung 3-30 B) und dann mit MLN8054, einem spezifischen Aurora A Inhibitor, behandelt (Manfredi et al., 2007). Die Konzentration wurde auf 15 nM festgesetzt, da bei dieser niedrigen Dosierung kein Zellzyklusarrest und keine Multipolarität induziert werden (Nam and van Deursen, 2014).



**Abbildung 3-30:** Inhibition von Aurora A reduziert mitotische Defekte in Zellen ohne RITA. (A) HeLa Zellen wurden mit sikön oder siRITA transfiziert und anschließend mit DMSO oder 15 nM MLN8054, einem spezifischen Aurora A Inhibitor, für 14 h behandelt. Behandelte Zellen wurden mit  $\alpha$ -Tubulin, phospho-Aurora A (T288), ACA und DNA für Fluoreszenzmikroskopie gefärbt. Maßstab: 5  $\mu$ m. (B) Zelllysate wurden mittels Western Blot analysiert.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle. (C) Das phospho-Aurora A (T288) Signal mitotischer Zellen wurde gemessen (A) (n = 60 Zellen je Bedingung). Die Ergebnisse stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.

Diese Konzentration war ausreichend um das Phosphorylierungssignals von Aurora A in Zellen ohne RITA um etwa 30% (Abbildung 3-30 C) zu reduzieren. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden die behandelten Zellen mit  $\alpha$ -Tubulin, Phospho-Aurora A (T288), ACA und die DNA gefärbt. Die Auswertung des Phänotyps ergab, dass Zellen ohne RITA erneut um 28 % erhöht fehlerhafte Chromosomenanordnung in der Metaphase und um 24 % erhöht fehlerhafte Chromosomenanordnung in der Anaphase im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse aus 3.2. Interessanterweise zeigte die

Behandlung mit MLN8054 eine Reduktion dieser mitotischen Defekte in Zellen ohne RITA (Abbildung 3-31 A und B). Dabei konnten mittels MLN8054 Behandlung die Metaphase Defekte von 43 % auf 22 %, sowie die Anaphase Defekte von 40 % auf 17 % reduziert werden.



**Abbildung 3-31:** Reduktion der Chromosomen Defekte in RITA depletierten Zellen nach Behandlung mit MLN8054. (A und B) Quantifizierung der falsch angeordneten Chromosomen in Metaphase Zellen (n=120 Zellen je Bedingung) und fehlerhafter Chromosomen Segregation in Anaphase Zellen (n=120 Zellen je Bedingung). Die Ergebnisse sind aus zwei unabhängigen Experimenten und werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. \* $p < 0,05$ .

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine erhöhte aktive Aurora A für die Induktion von mitotischen Defekten in Abwesenheit von RITA mitverantwortlich ist. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Depletion von RITA zu einer Erhöhung an aktiver Aurora A führt und dies die mitotischen Defekte teils erklären kann. Durch Verwendung von MLN8054 konnten die mitotischen Defekte in RITA depletierten Zellen wieder reduziert werden.

---

## 4 Diskussion

---

In Zellen ist eine Vielzahl von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) für die MT-Nukleation und Dynamik zuständig. Darüber hinaus gibt es Proteine, die die MTs miteinander verknüpfen und die MTs für den Transport nutzen. Die Kombination dieser verschiedenen Aktivitäten führt zu der Selbstorganisation der MTs in ein funktionelles Netzwerk der Zelle (Alfaro-Aco und Petry, 2015). Die gemeinsame Eigenschaft von MAPs, die Bindung an Tubulin, bietet die Möglichkeit diese Interaktion zu manipulieren und somit den Einsatz von Tubulin-Bindungs-Agenzien (TBAs) in der Krebstherapie zu beeinflussen (Bhat und Setaluri, 2007). In der Mitose wird in Abhängigkeit von diversen Motor- und nicht-Motor Proteinen die bipolare mitotische Spindel durch dynamische MTs geformt (Yount et al., 2015). Somit ist eine Feinabstimmung der MT-Dynamik essentiell für den fehlerfreien Verlauf der Mitose. Die Deregulation führt zu chromosomaler Instabilität, ein Merkmal der Tumorgenese ist (Brouhard und Rice, 2014; Yount et al., 2015). Neben der Rolle von RITA in der Regulation des Notch-Signalweges, sind weitere Funktionen unbekannt. Da RITA in mit den MTs assoziiert vorliegt (Wacker et al., 2011), sollte in dieser Dissertation die physiologische Funktion von RITA in der Mitose an den MTs untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass RITA die MT-Dynamik beeinflusst und für den fehlerfreien Ablauf der Mitose benötigt wird. Mittels der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass RITA als neues MAP präzise reguliert sein muss und die Depletion sowie Überexpression von RITA den Prozess der Mitose negativ beeinflussen.

---

### 4.1 RITA assoziiert mit der mitotischen Spindel

---

Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass GFP-RITA an Tubulin *in vitro* bindet (Wacker et al., 2011). Anhand von eigenen Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass RITA in den verschiedenen Phasen der Mitose mit dem Mikrotubuli-Netzwerk assoziiert ist. Wie bei vielen anderen MAPs, die Komponenten der mitotischen Spindel sind (Bulinski und Borisy, 1980; Scholey et al., 1984), ist die Lokalisation von RITA an der mitotischen Spindel in der Metaphase und an den interpolaren MTs in der Anaphase fokussiert (Abbildung 3-1). Diese ersten Beobachtungen lassen auf eine Rolle RITA's in der Mitose schließen. Deutlich zeigt sich bei Zellen, die RITA stark überexprimieren, dass die MTs irreguläre Strukturen

---

bilden. Anhand von STORM Mikroskopie wurde deutlich, dass RITA an die MT-Oberfläche lokalisiert und dass die Überexpression zu dickeren irregulären MT-Bündeln führt. Auch die Verteilung der MTs in RITA überexprimierenden Zellen erwies sich als inhomogener und zeigte keine normale Gaußverteilung (Steinhäuser et. al., 2016). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass ein erhöhtes Proteinlevel an RITA die MTs stärker ummantelt und somit den Zugang von MAPs bzw. Enzymen wie Depolymerasen blockieren kann, was dann wiederum zu stark stabilisierten MTs mit geringer Plastizität führen kann. Basierend auf diesen Experimenten wurde in einem *in vitro* Depolymerisierungs-Assay untersucht, welchen Effekt rekombinantes RITA auf MTs hat. Nach Zugabe von GST-RITA zu den MTs, wurden innerhalb kürzester Zeit stark gebündelte MTs geformt (Abbildung 3-2). Diese Daten weisen darauf hin, dass RITA *in vitro* eine *bundling*-Aktivität besitzt und ein neues Mitglied der MAPs bzw. MT-*bundling* Proteine sein kann. Da RITA Taxol-stabilisierte MTs *in vitro* bündelt, könnte dies auf eine MT-*bundling* Fähigkeit schliessen lassen. Gleiche Effekte zeigt der bekannte Vertreter der MT-*bundling* Proteine PRC1 (*Protein regulator of cytokinesis*). PRC1 bündelt *in vitro* MTs und spielt eine wichtige Rolle in der Zytokinese. Die Überexpression von PRC1 führt in Interphase Zellen zu irregulären MT-Strukturen (Mollinari et al., 2002), wie auch bei Überexpression von RITA zu beobachten war. Da PRC1 bevorzugt an die antiparallelen MTs bindet, diese dort bündelt und stabilisiert (Bieling et al., 2010), ist eine Rolle von RITA als *bundling* Protein an den antiparallelen MTs in den späten mitotischen Phasen (Abbildung 3-1 Reihe 3 und 4, GFP-RITA) nicht auszuschließen. Welche Rolle RITA in dem Komplex der Zentralspindel und der Zytokinese spielt, benötigt weitere experimentelle Untersuchungen, wodurch neue Rückschlüsse auf die Funktion von RITA in der Mitose geschlossen werden können.

---

#### 4.1.1 RITA wird im Zellzyklus und der Mitose reguliert

---

Aufgrund der Lokalisation von RITA, stellte sich die Frage, ob RITA während des Zellzyklus konstant exprimiert wird. Experimente zeigten, dass RITA in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich exprimiert wird. Verschiedene Zelllinien in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Abbildung 3-3 C) zeigten unterschiedliche Proteinexpressionen. Das Vorhandensein von Doppel- oder Dreifachbänden lässt vermuten, dass RITA modifiziert vorliegt. Welche Modifikation konnte aber bisher nicht eindeutig geklärt werden. Durch Behandlung der Zelllysate mit  $\lambda$ -Phosphatase konnte nicht genau analysiert werden, ob es sich bei der oberen beobachteten Bande um eine phosphorylierte Form von RITA handelt. Um

---

dies genauer zu klären, muss die Postmodifikation von RITA mittels Massenspektrometrie oder 2D-Gelelektrophorese untersucht werden.

Anhand der durchgeführten Thymidin-Freilassungs-Kinetik konnte gezeigt werden, dass RITA während des Zellzyklus wenig reguliert wird. Die Expression von RITA steigt zur Mitose hin leicht und fällt zur G1-Phase wieder ab (Abbildung 3-3 A und B). Dies spricht für eine individuelle Kontrolle des Proteinlevels in der Mitose. Da beim Eintritt in die Mitose das Mikrotubuli-Netzwerk drastische dynamische Veränderungen durchläuft, um die Chromosomen korrekt zu separieren (Honore et al., 2005), könnte RITA als Mikrotubuli-assoziiertes Protein an diesem dynamischen Prozess in der Mitose beteiligt sein. Zudem konnte anhand einer Kern-Zytoplasma-Trennung gezeigt werden, dass RITA hauptsächlich im Zytoplasma in der Prophase und Prometaphase vorliegt und zu einem geringen Teil im Kern in der G1/S-Phase (Abbildung 3-4 A). Da RITA ein NES (Nuklear Export Signal) und ein NLS (Nuklear Lokalisations Signal) besitzt, lässt sich daraus schließen, dass der Prozess des Ex- bzw des Importes von RBPJ vorwiegend in der G1/S-Phase stattfindet. Somit ist die subzelluläre Verteilung von RITA und RBPJ kritisch für den Notch-Signalweg und damit auch für weitere Signalwege (Wacker et al., 2011).

Aufgrund der Lokalisation von RITA an den MTs wurden Immunpräzipitationen durchgeführt um die physische Interaktion mit Tubulin zu belegen. In Prometaphase-synchronisierten Zellen, mit Flag-RITA transient transfiziert, konnte die Interaktion von RITA mit  $\alpha$ -Tubulin bestätigt werden. Auch in der Tubulin-Immunpräzipitation konnte Flag RITA als Bindungspartner identifiziert werden (Abbildung 3-4 B). Somit interagieren RITA und  $\alpha$ -Tubulin *in vivo* und *in vitro* miteinander. Die Interaktion von RITA mit Tubulin kann somit einen Einfluss auf das MT-Verhalten und die Struktur haben. MAPs sind im Wesentlichen an der Regulation der dynamischen Eigenschaften von MTs beteiligt und ihre Interaktionen mit verschiedenen Zellstrukturen führt dazu, dass die MTs effektiv von der Zelle genutzt werden können um die Chromosomen während der Mitose richtig auszurichten (Maiato et al., 2004). Inwieweit eine Überexpression von RITA die Assoziation anderer MAPs bzw. Proteine und die Struktur der MTs beeinflusst, muss in Zukunft genauer untersucht werden

---

#### **4.1.2 Der Ablauf des Zellzyklus ist in Abwesenheit von RITA gestört**

---

Nach den ersten Beobachtungen, dass RITA mit den MTs assoziiert und im Zellzyklus exprimiert wird, sollte das Verhalten der Zellen ohne RITA untersucht werden. Die Thymidin-Freilassungskinetik zeigte, dass die Depletion von RITA die mitotische Progression



stört (Abbildung 3-5 A und B), da das Level von Cyclin B1 bei Zellen ohne RITA auch noch nach 12 h erhöht vorlag. Die Proteinmenge von Cyclin B1 akkumuliert am Ende der G2-Phase und degradiert zu Beginn der Anaphase wodurch die Zellen aus der Mitose treten (Pines und Hunter, 1991). Dies wurde auch anhand der FACS Analysen deutlich. Nach 7 h traten die Kontrollzellen in der G2/M-Phase ein, jedoch befanden sich bereits mehr der Zellen ohne RITA in der G2/M-Phase. Nach 10 h befanden sich noch traten die Kontrollzellen aus der G2/M-Phase aus, Zellen ohne RITA verließen jedoch noch vermehrt in G2/M-Phase (Abbildung 3-5 C und D). Dieses Phänomen kann auf eine deutlich bessere Synchronisation der Zellen ohne RITA beruhen oder auf einen verzögerten Austritt aus der Mitose hinweisen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde eine RO-3306 Zeitkinetik durchgeführt, wobei RO-3306 ein spezifischer Cdk1 Inhibitor ist und die Zellen reversibel in der G2-Phase arretieren kann (Vassilev et al., 2006). Auch hier zeigte sich erneut, dass die Zellen mit RITA die Mitose problemlos durchlaufen und aus ihr austreten, Zellen ohne RITA dagegen Probleme beim Austritt aus der Mitose aufwiesen. In der Western Blot Analyse der RO-3306 Kinetik zeigte sich ein deutlich erhöhtes Cyclin B1 Level bei Zellen ohne RITA selbst nach 1.5 h, wogegen Kontrollzellen zu diesem Zeitpunkt bereits aus der Mitose ausgetreten waren (Abbildung 3-6 A). Zusätzlich wurde der mitotische Marker phospho-Histon H3 gefärbt (Hendzel et al., 1997; Wei et al., 1998). Auch hier zeigte sich eine stärkere Akkumulation von phospho-Histon H3 bei Zellen ohne RITA, selbst nach 4 h Freilassung aus dem RO-3306 Block. Dies konnte zusätzlich in einer FACS Messung mit dem Antikörper gegen phospho-Histon H3 gezeigt werden. Nach 0.5 h Freisetzung konnten in RITA depletierte Zellen mehr positive phospho-Histon H3 positive Zellen im FACS gemessen werden, in Kontrollzellen dagegen weniger positive Zellen. Dies zeigt erneut deutlich, dass Zellen ohne RITA nicht ohne Verzögerung aus der Mitose austreten können. Da Histon H3 am Anfang der G2-Phase phosphoryliert wird, ein Maximum in der Prophase erreicht und zu Anaphase wieder dephosphoryliert wird (Prigent und Dimitrov, 2003), kann das erhöhte Signal an phospho-Histon H3 in RITA depletierten Zellen auf eine zeitliche Verzögerung in der Pro- bzw. Metaphase deuten. Die Phosphorylierung von Histon H3 wird durch die Kinase Aurora B katalysiert (Crosio et al., 2002), deshalb sollte in Zukunft die Expression und die Aktivität dieser Kinase in Ab- und Anwesenheit von RITA näher untersucht werden. Ob es sich bei diesem Phänotyp um eine mitotische Verzögerung handelt, sollte durch *Time-lapse* Videomikroskopie geklärt werden. Deutlich wird, dass RITA für den fehlerfreien Ablauf der Mitose benötigt wird.

---

### 4.1.3 Fehlregulation von RITA und die Folgen für die Zellzyklus Progression

---

Zur Untersuchung der Funktion von RITA *in vivo* während der Mitose wurden *Time-lapse* Videomikroskopie Versuche durchgeführt. Durch diese Technik können die Länge der Mitose bzw. des Zellzyklus und auch die Länge mitotischer Subphasen bestimmt werden. Auch das Auftreten von Chromosomendefekten während der Metaphase oder *lagging* Chromosomen während der Anaphase können dadurch analysiert werden. Die Analyse der *Time-lapse* Daten ergab, dass die Mitose von RITA depletierten Zellen verlängert war (Abbildung 3-7 A). Durch eine präzise Analyse der mitotischen Subphasen zeigte sich, dass die Prometaphase und die Metaphase signifikant verlängert waren (Abbildung 3-7 B). Auch in der Metaphase zeigte sich eine Verlängerung bei Zellen ohne RITA. Diese Verzögerungen könnten die beobachteten Fehler in der Chromosomenanordnung erklären (Abbildung 3-7 C, weiße Pfeile). Eine genaue Auswertung dieser Defekte ergab, dass Zellen ohne RITA im Vergleich zu den Kontrollzellen mehr Chromosomendefekte in der Metaphase aufwiesen (Abbildung 3-8 A und C). Die Segregations Defekten in Zellen ohne RITA ebenfalls erhöht. Auch die gewonnen *in vivo* Daten der MEFs zeigen, dass RITA für die Mitose und die MT-Dynamik eine Rolle spielt. Im Vergleich zu Wildtyp-RITA Mäusen, zeigten die Knockout-Mäuse vergrößerte Lymphknoten in Hals-, Bauch- und anderen Bereichen. Sie litten an Lymphomen und Invasivität in Lunge, Bauchspeicheldrüse und anderen Organen. Detaillierte Charakterisierung und Phänotypisierung sind derzeit im Gange um die Rolle von RITA in der Tumorgenese aufzuklären. Der beobachtete Phänotyp könnte darauf schließen, dass RITA als MAP fungiert und einen Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik hat. Viele andere MAPs haben einen Einfluss auf die MT-Dynamik. Beispielsweise bindet das Protein Stathmin freie Tubulindimere und begünstigt die Hydrolyse von GTP (Belmont und Mitchison, 1996; Howell et al., 1999). Proteine der Kinesin-13 Familie bewirken dagegen eine Konformationsänderung im Tubulindimer, welche die Depolymerisationsrate begünstigt. Die Depletion von ASAP (*Aster-Associated Protein*), welches zu der Klasse der MAPs gehört, bewirkt eine Verzögerung in der Prometa- bzw. Metaphase und es wurden vermehrt Chromosomendefekte beobachtet (Saffin et al., 2005). Ein anderes Protein, Hic1 (*HEC1/NDC80 interacting, centrosome associated 1*) ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Spindel Integrität und der chromosomalen Stabilität, aufgrund der Fähigkeit, MTs zu bündeln und zu stabilisieren (Wu et al., 2008). In welche Kategorie der MAPs RITA hinein gehört und welche physiologische Funktion RITA an den MTs hat, bedarf weiterer Untersuchungen. Auch ob die Phosphorylierung von RITA durch mitotische Kinasen einen Einfluss auf die Funktion, sowie die Lokalisation hat, ist Bestandteil zukünftiger

---

Untersuchungen.

Um präzise Aussagen über das Ausmaß der beobachteten Chromosomendefekte treffen zu können, wurden diese mittels Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Dabei wurden fehlerhafte Chromosomenanordnung in Metaphase und Anaphase Zellen bewertet. Dabei ergab sich in zwei verschiedenen Zelllinien, HeLa und HCT116 Zellen, dass Zellen ohne RITA vermehrt Chromosomen Defekte aufweisen (Abbildung 3-9 A, B und C). Diese Ergebnisse bestätigen die *Time-lapse* Analysen. Zusätzlich wurden vermehrt multipolare Spindeln beobachtet. Zellen ohne RITA zeigen mehr multipolare Spindeln (Abbildung 3-9 D) im Vergleich zu Kontrollzellen. Multipolarität ist eine Konsequenz von Amplifikation der Zentrosomen, Zytokinesefehlern oder von Zellfusion. Auch die Überexpression von Aurora A und andere mitotischer Kinasen kann als Folge Zentrosomen Amplifikation haben (Nigg, 2002). In RITA depletierten Zellen wurden vermehrt Zentrosomen Aberrationen beobachtet, welche als Konsequenz zu multipolaren Spindeln führen können. RITA lokalisiert zudem an den Zentrosomen und könnte dort eine Rolle in der Zentrosomenduplikation bzw. Reifung spielen. Weitere intensive Untersuchungen sind nötig, um die Funktion von RITA im Zentrosomenzyklus aufzuklären. Zur Aufklärung weshalb in RITA depletierten Zellen vermehrt Chromosomendefekte zu beobachten waren, wurde der interzentromere Abstand in der Metaphase gemessen. Dieser Abstand ist ein funktioneller Marker für den richtigen Aufbau an Spannung zwischen den MTs und den Kinetochoren. In Zellen ohne RITA wurde ein verkürzter interzentromer Abstand im Vergleich zu Kontrollzellen gemessen (Abbildung 3-11 A und B). Dies lässt eine zu hohe Spannung vermuten und dies führt wiederum zu Fehlverknüpfungen zwischen den MTs und Kinetochoren. In diesem Zusammenhang wurde die Kinase Aurora B näher betrachtet, da diese für die Korrektur von Fehlverknüpfungen verantwortlich ist (Carmena et al., 2012). Nach Depletion von RITA wurden keine Unterschiede in der Lokalisation von Aurora B an den Kinetochoren beobachtet (Abbildung 3-12). Somit ist der verkürzte interzentromere Abstand nicht auf eine Fehllokalisation von Aurora B zurückzuführen, impliziert aber eine fehlregulierte MT-Dynamik, welche zu Fehlern in der Chromosomen-Separation führen kann. Durch ein *rescue* Experiment konnte gezeigt werden, dass der beobachtete Phänotyp auf das nichtvorhandensein von RITA zurückzuführen ist. Auch hier wiesen Zellen ohne RITA deutlich mehr Chromosomendefekte auf (Abbildung 3-14 B und C). Zellen hingegen, welche nach siRNA wieder mit GFP-RITA transfiziert wurden, zeigten weniger fehlerhafte Chromosomenanordnungen in der Metaphase bzw. Anaphase im Vergleich zu Kontrollzellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Wiedereinbringen der GFP-RITA  $\Delta$ tub Mutante, die nicht mehr effizient an Tubulin binden kann, zu mehr Chromosomen Defekten führte als die siRNA gegen RITA alleine. Dies

---

zeigt deutlich, dass die funktionelle Tubulin-Bindungsdomäne von RITA essentiell für die korrekte Anordnung der Chromosomen ist und dass die Funktion von RITA an den MTs auf dieser Bindung beruht.

---

## 4.2 RITA beeinflusst den Spindel-Phänotyp und die MT-Dynamik

---

Aufgrund der möglichen Rolle von RITA als MAP, wurde dessen Einfluss auf die Spindelorganisation näher untersucht. Mittels Immunfluoreszenz wurde der Spindelphänotyp nach Depletion von RITA analysiert. In den vorherigen Immunfluoreszenz Experimenten wurde bereits beobachtet, dass Zellen ohne RITA eine höhere MT-Dichte in der Mitose aufwiesen und die Spindeln verkürzt wirkten. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Bilder ergab, dass Zellen ohne RITA um 1,3  $\mu\text{m}$  signifikant verkürzte Spindeln aufwiesen (Abbildung 3-16 A und C). Einen ähnlichen Phänotyp verursacht die Depletion von CLASP1 und CLASP2 (*CLIP-associating protein*), zwei Regulatoren der MT-Dynamik (Young et al., 2014). Auch die Depletion von HSET, einem Protein der Kinesin-14 Familie, hat zur Folge eine Verkürzung der Spindellänge, welche wahrscheinlich durch eine verringerte Kraftausübung innerhalb der Spindel entsteht. Die Überexpression hingegen verlängert die Spindeln signifikant (Cai et al., 2009b). Die Messung der Fluoreszenzintensität der mitotischen Spindel ergab zudem eine Erhöhung der  $\alpha$ -Tubulin Dichte (Abbildung 3-15 A und D, siRITA). Als Positivkontrolle für die Erhöhung der Tubulinpolymergehaltes wurden siRNA gegen MCAK, eine MT Depolymerase, verwendet (Sanhaji et al., 2014). In der FACS Messung wiesen Zellen ohne RITA einen höheren Tubulinpolymergehalt von  $\alpha$ -Tubulin auf als Zellen in denen MCAK depletiert wurde (Abbildung 3-15 F). Der erhöhte Tubulinpolymergehalt in Zellen ohne RITA unterstützt die Vermutung, dass RITA eine Rolle der Mikrotubuli-Nukleation spielt. Eine interessante Studie zeigte, dass eine erfolgreiche Zellteilung von der Gesamtmenge der MTs abhängt (Bertalan et al., 2015). Wenn die Anzahl an MTs zu klein ist, kann es nicht zur Bi-Orientierung der Chromosomen kommen, während bei einer zu großen Anzahl an MTs, nicht alle Chromosomen korrekt in der Metaphaseplatte angeordnet werden können (Bertalan et al., 2015). Verkürzte Spindeln, fehlerhafte Chromosomenanordnungen und eine erhöhte MT-Dichte wurde auch in PTEN depletierten Zellen, einem Tumor Suppressor und Regulator von Eg5, beobachtet (He et al., 2016). Welchen Einfluß RITA auf die Krafterzeugung innerhalb der mitotischen Spindel hat, z.B. durch MT-sliding oder bundling, muss in Zukunft näher untersucht werden. Zudem kann RITA die Interaktion andere Proteine wie Eg5 oder andere Motorproteine mit den MTs

---

beeinflussen. Somit sind weitere Untersuchungen nötig, um den komplexen Zusammenhang zwischen RITA und dem Mikrotubuli-Netzwerk zu verstehen.

Um diese Beobachtung und um eine mögliche Rolle RITAs in der Modulation der MT-Dynamik näher zu untersuchen wurde ein MT-*regrowth assay* durchgeführt (Sanhaji et al., 2014). Dabei zeigten Kontrollzellen eine normale Dynamik der MTs und bereits nach kurzer Zeit war die mitotische Spindel fast vollständig aufgebaut (Abbildung 3-16 A und B, siKon). Zellen ohne RITA zeigten dagegen schon von Anfang an weniger depolymerisierte MTs und die MT-Dynamik erwies sich als gestört (Abbildung 3-16 A und B, siRITA). Daraus lässt sich schließen, dass MTs in Zellen ohne RITA resistenter gegen Kälte-induzierte Depolymerisation und somit stabiler sind. Aus diesem Grund könnte RITA als MAP einen indirekten Einfluss auf andere MAPs, wie De- und Polymerasen (MCAK und Kif2A) in der Region der mitotischen Spindel haben. Die Depletion des MAPs Stathmin/Op18 erhöht die Bildung neuer Mikrotubuli durch Minderung der Depolymerisationsrate, da Stathmin/Op18 unpolymerisiertes Tubulin bindet und destabilisiert (Lawler, 1998). Um den Zusammenhang zwischen RITA als MAP und der Polymerisierungs- und Depolymerisierungsrate der MTs zu verstehen, müssen neue Untersuchungen *in vitro* in Zukunft durchgeführt werden.

Aufgrund der beobachteten Chromosomendefekte und des erhöhten Tubulinpolymer-Gehalts, wurde zusätzlich die Stabilität der Kinetochor MTs untersucht. Da diese K-MTs für die korrekte Befestigung und Segregation der Chromosomen zuständig sind, könnte eine Veränderung ihrer Stabilität die mitotischen Defekte teilweise erklären. Es zeigte sich, dass Zellen ohne RITA nach Depolymerisation aller nicht K-MTs, eine höhere Intensität der K-MTs im Vergleich zu Kontrollzellen aufwiesen (Abbildung 3-18 A). Diese Beobachtung weist zusätzlich auf eine gestörte MT-Dynamik hin und eine erhöhte Stabilität kann zu Fehlern in der Segregation der Chromosomen führen. Eine veränderte K-MT-Stabilität wurde auch in APC (*Adenomatous polyposis coli protein*) depletierten Zellen beobachtet. Die K-MTs waren hyperstabil und der interzentromere Abstand war verkürzt (Bakhoum et al., 2009; Dikovskaya et al., 2007). Der Verlust der interkinetochoren Spannung sollte den Spindel-Kontrollpunkt aktivieren, diese Zellen durchliefen die Mitose mit einem reduzierten Level an BubR1 (*Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase, budding uninhibited by benzimidazole-related 1*) (Dikovskaya et al., 2007). Zellen mit einem ungesättigten Spindel-Kontrollpunkt rekrutieren BUB1, BUBR1, BUB3, MAD1, MAD2 und CDC20 zu den ungebundenen Kinetochoren (Bolanos-Garcia and Blundell, 2011). Da die Verzögerung der Mitose in RITA depletierten Zellen nicht prägnant ist, könnte die Aktivierung des Spindel-Kontrollpunkt durch die induzierten Defekte nur von kurzer Dauer sein und die Zellen gehen in die Anaphase über. Da Zellen ohne RITA die Mitose mit einer Verzögerung durchlaufen,

---

muss untersucht werden, inwieweit der Spindel-Konrollpunkt beeinflusst ist. Somit könnte RITA als MAP wichtig für die Balance zwischen stabilen und instabilen MTs und damit ein Modulator für die Elastizität der MTs sein (Rubinstein et al., 2009).

---

#### 4.2.1 RITA moduliert die Acetylierung von $\alpha$ -Tubulin

---

Posttranslationale Modifikationen von Tubulin regulieren und beeinflussen das Verhalten und die Eigenschaften von den Mikrotubuli (Janke und Chloë Bulinski, 2011). RITA assoziiert mit MTs und moduliert die Lysin 40 Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin. Die Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin lokalisiert innerhalb der luminalen Seite der MTs (L'Hernault und Rosenbaum, 1985; Soppina et al., 2012). Diese Modifikation ist mit stabileren, langlebigeren und weniger dynamischen MTs verbunden (Maruta et al., 1986; Piperno et al., 1987; Webster und Borisy, 1989) obwohl eine direkte funktionelle Bedeutung von der Lysin 40 Acetylierung unklar bleibt. Es wird vermutet, dass die Acetylierung von MTs, deren Stabilität und Dynamik über indirekte Ereignisse, wie die Interaktionen von anderen Proteinen mit den MTs beeinflusst (Song and Brady, 2015).

Aufgrund der veränderten MT-Dynamik wurden die verschiedenen Tubulin Postmodifikation mittels Western Blot analysiert (Abbildung 3-19 B). Dabei zeigte sich das polyglutamyliertes Tubulin und detyrosiniertes Tubulin nicht verändert waren. Eine signifikante Änderung konnte allerdings im Level an acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin festgestellt werden. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Depletion von RITA die MT Eigenschaften beeinflusst und zu stabilisierten MTs führt. Da Zellen ohne RITA ein höheres Level an acetyliertem Tubulin aufwiesen, wurde die genaue Lokalisation von RITA und acetyliertem Tubulin mittels Immunfluoreszenz Analysen untersucht (Abbildung 3-20). In der Metaphase kolokalisierten beide Proteine an der mitotischen Spindel (Abbildung 3-20 A, Zeile 1). In der Anaphase dagegen lokalisierte RITA dominant an den interpolaren MTs, acetyliertes Tubulin hingegen war vermehrt an den Spindelpolen lokalisiert (Abbildung 3-20 A, Zeile 2). In der späten Anaphase konzentrierte sich acetyliertes Tubulin in der Mitte, dort befestigen stabile MTs die Chromosomen, und an den Spindelpolen. RITA dagegen wurde hauptsächlich an den Polen und an den interpolaren MTs gefunden (Abbildung 3-20 A, Zeile 3). In der Telophase/Zytokinese war RITA prominent im *midbody* und der Zentralspindel lokalisiert. Acetyliertes Tubulin dagegen wurde nicht direkt am *midbody* gefunden (Abbildung 3-20 A, Zeile 4). Das RITA direkt am *midbody* zu finden ist, könnte ein weiteres Indiz für eine Rolle in der Zytokinese sein ähnlich dem Protein PRC1 (Mollinari et al., 2002). Die Lokalisation

---

von RITA ähnelt vieler andere Proteine die die Eigenschaften der MTs modulieren, wie TPX2 und Eg5 (Ma et al., 2011), PTEN (He et al., 2016), APC (Dikovskaya et al., 2007), ASAP (Saffin et al., 2005) und Hice1 (Wu et al., 2008). Durch die Reexpression von RITA Wildtyp, aber nicht RITA  $\Delta$ tub, konnte das Level an acetyliertem Tubulin wieder nahezu auf das Level von Kontrollzellen gebracht werden (Abbildung 3-21 A und B). Auch der Abstand der Pole und der Tubulinpolymer Gehalt konnten durch Einbringen von RITA Wildtyp wieder hergestellt werden (Abbildung 3-22 A und B). Die  $\Delta$ tub Mutante wies dagegen eine noch stärkere Zunahme an acetyliertem Tubulin auf, was auf einen dominant-negativen Effekt zurück zu führen ist. Dadurch wird deutlich, dass das Vorhandensein der Tubulin-Bindungsdomäne in RITA für die Funktion an den MTs und Modulation der Acetylierung von Lysin 40 in  $\alpha$ -Tubulin wichtig ist. Desweiteren sollte der Zusammenhang zwischen anderen Enzymen, die bevorzugt acetyliertes Tubulin erkennen wie beispielsweise Katanin (Sudo und Baas, 2010) in Zukunft untersucht werden.

---

#### **4.2.2 RITA hat einen Einfluss auf die Komplexbildung von HDAC6/Mec-17 mit Tubulin**

---

Die Acetylierung von Lysin 40 von  $\alpha$ -Tubulin wird durch die Acetyltransferase Mec-17 (Akella et al., 2010) und die Deacetylasen HDAC6 und SIRT2 katalysiert (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003). Neuere Daten zeigen allerdings, dass SIRT2 keine signifikante Auswirkung auf die Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin hat (Bobrowska et al., 2012). Wie die Acetyltransferase Mec-17 den Zugang zum Lysin 40 innerhalb der luminalen Seite findet, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Vor kurzem wurde berichtet, dass Mec-17 an die äußere Oberfläche der MTs bindet, teilweise an den Tubulin-C-Terminus, der wiederum den Zugang zu der luminalen Seite erleichtert wenn seitliche Öffnungen zwischen den Protofilamenten der MTs entstehen (Howes et al., 2014). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression, als auch die Depletion von RITA die Assoziation von HDAC6 und Mec-17 mit den MTs beeinflusst und somit auch die Modulation der Tubulin Acetylierung an Lysin 40. Die Anwesenheit von RITA fördert möglicherweise den Zugang von Mec-17 zur luminalen Seite der MTs durch eine eventuelle Konformationsänderung von Tubulin. Von Heppenstall *et. al.* wurde publiziert, dass Mec-17 die Mikrotubuli destabilisiert und dessen Dynamik unabhängig der Acetylierung beschleunigt. Der Einfluss von Mec-17 auf die MT-Dynmik ist somit komplexer als vermutet und es ist die Anwesenheit und die Interaktion mit Tubulin oder anderer Schlüsselregulatoren der MT-Dynamik, die eine Rolle spielen (Kalebic

---

et al., 2013). Eine andere Studie zeigte, dass die Acetylierung keinen Effekt auf die Struktur und Konformation von  $\alpha$ -Tubulin hat, aber die Bindung anderer Proteine innerhalb der luminalen Seite beeinflussen kann (Kalebic et al., 2013). Es ist bis heute unklar, welche Proteine in der luminalen Seite von  $\alpha$ -Tubulin binden aber die Anwesenheit ist in verschiedenen Zelltypen bestätigt (Garvalov et al., 2006). Weiterer Untersuchungen sind nötig, um den Zusammenhang von RITA, der Acetylierung und dieser Proteine innerhalb des Lumen von  $\alpha$ -Tubulin zu verstehen. Da HDAC6 die Haupt-Deacetylase für  $\alpha$ -Tubulin ist, könnte dies auch das erhöhte Level an acetyliertem Tubulin erklären (Abbildung 3-23 A). Auch in Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass HDAC6 in einem Komplex mit RITA und Tubulin vorkommt (Abbildung 3-24 A). Die Depletion von RITA beeinflusste die Assoziation von HDAC6 mit Tubulin negativ (Abbildung 3-24 B). In der Fraktionierung der MTs konnte eine Erniedrigung an HDAC6 an den MTs in Abwesenheit von RITA festgestellt werden (Abbildung 3-25). Die Daten deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von RITA die Komplexbildung zwischen HDAC6 und Tubulin fördert, die Abwesenheit dagegen diese Assoziation stört. Auch die *in vitro* als auch *in vivo* Daten untermauern die Ergebnisse, da anhand von dSTORM deutlich wurde, dass RITA die Struktur der MTs beeinflusst (Abbildung 3-2). Ein weiterer Hinweis darauf, dass RITA Einfluss auf die Bindung von HDAC6 mit den MTs zeigte sich darin, dass in der Immunpräzipitationen von Flag RITA wt, Tubulin sowie HDAC6 zu finden waren. Mit der  $\Delta$ tub Mutante konnte dagegen eine deutlich verringerte Bindung festgestellt werden (Abbildung 3-26 A). Dies konnte zusätzlich in einem *Pulldown assay* gezeigt werden (Abbildung 3-26 B). Da HDAC6 freie Tubulin-Dimere bevorzugt deacetyliert (Perdiz et al., 2011) und RITA sowohl freies und polymerisiertes Tubulin bindet, könnte RITA als Adaptorprotein für HDAC6 dienen. In Abwesenheit oder bei Expression der  $\Delta$ tub Mutante ist die Bindung von HDAC6 an die freien Tubulin-Dimere möglicherweise gestört und der Prozess der Deacetylierung verhindert. Im Jahr 2009 publizierte die Gruppe von Bershadsky, dass die Inhibition von HDAC6 durch TSA (Trichostatin A) oder Tubacin, nicht aber die Runterregulation, trotz erhöhtem acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin das Wachstum der MTs beschleunigt (Zilberman et al., 2009). Eine andere Publikation zeigte, dass die Überexpression von HDAC6 die Depolymerisation der MTs durch Demecolcin beschleunigt und die MTs somit sensibilisiert für depolymerisierende Reagenzien sind (Matsuyama et al., 2002). Somit könnte RITA ein Gleichgewicht zwischen der Deacetylierung durch HDAC6 und der Acetylierung durch Mec-17 herstellen und somit  $\alpha$ -Tubulin in einem dem Kontext entsprechenden deacetylierten elastischen Zustand halten, um die dynamische Veränderung der MTs zu garantieren. Der Zusammenhang zwischen RITA und HDAC6/Mec-17 muss in Zukunft genauer untersucht werden, z.B. durch Messung



---

der HDAC6-Aktivität in An- und Abwesenheit von RITA. Zusammenfassend wirkt sich eine Deregulation von RITA, durch Depletion oder Überexpression, auf die MT-Dynamik, MT-Stabilität und den Zellzyklus aus, was Konsequenzen für die Chromosomenanordnung und den Spindelaufbau hat. Diese Daten zeigen, dass RITA genau reguliert sein muss und jede Störung im Proteinlevel von RITA zu Veränderungen des MT-Verhaltens führt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die genaue dynamische Bindung von RITA an Tubulin/MTs zu verstehen, die Beziehung zu HDAC6 und Mec-17 und RITAs Einfluss und Korrelation mit anderen MAPs.

---

#### **4.3 Erhöhtes Aurora A Level in Zellen ohne RITA ist partiell für die Chromosomendefekte verantwortlich**

---

Um die beobachteten Chromosomen Defekte weiter zu erklären, wurde untersucht, welche mitotischen Proteine von der Depletion RITAs beeinflusst werden. Aurora A ist in multiplen mitotischen Ereignissen involviert, wie in der Reifung und Trennung der Zentrosomen, die Assemblierung der bipolaren Spindel und der Anordnung der Chromosomen (Carmena et al., 2009; Marumoto et al., 2005). Die Aktivität von Aurora A steigt in der späten G2 Phase und erreicht ihr Maximum in der Mitose, welche durch diverse Koaktivatoren wie Ajuba in G2 (Hirota et al., 2003) und TPX2 in der Mitose reguliert wird (Bayliss et al., 2003). TPX2 rekrutiert Aurora A zu der mitotischen Spindel und aktiviert diese dort durch Induktion einer Konformationsänderung, wodurch die Auto-Phosphorylierung von Threonin 288 in der T-Schleife stattfindet. Diese ist somit vor der Dephosphorylierung durch die Protein Phosphatase 1 geschützt (Carmena et al., 2009). Bei den Analysen wurde deutlich, dass die phosphorylierte aktive Form von Aurora A in Zellen ohne RITA erhöht ist (Abbildung 3-27 A). Die Auswertung der Fluoreszenzintensitätsmessung ergab ein erhöhtes Signal in der Prophase, erhöhtes Signal in der Prometaphase und ein erhöhtes Signal in der Metaphase (Abbildung 3-27, A und B). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass in Abwesenheit von RITA die aktive Form von Aurora A von der Prophase bis zu Metaphase signifikant erhöht ist. Dies wurde zusätzlich in Western Blot Analysen bestätigt (Abbildung 3-28 A, Reihe 3). Zudem konnte ein leicht erhöhtes Proteinlevel an TPX2, einem mitotischen Aktivator von Aurora A, festgestellt werden (Abbildung 3-28 A, Reihe 4 und B). Eine Studie zeigte interessanterweise, dass die Degradation von Aurora A durch Cdh1 (Aktivator des Anaphase-Promoting-Complex APC) von der Interaktion mit TPX2 abhängt (Giubettini et al., 2011). Somit könnte das erhöhte Level von TPX2 in RITA depletierten Zellen die rechtzeitige Degradation von Aurora

---

A stören. Die Auswertung des Verhältnisses von p-Aurora A/Aurora A ergab, dass nicht das Proteinlevel von Aurora A für das erhöhte Level an aktiver Aurora A verantwortlich ist (Abbildung 3-28 C). Zusätzlich wurden diese Ergebnisse anhand von Fluoreszenzintensitätsmessung von Aurora A und aktiver Aurora A in RITA depletierten Metaphase Zellen bestätigt (Abbildung 3-28 D und E). Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Depletion das Proteinlevel der aktiven Aurora A, nicht aber der nicht-aktiven Aurora A, erhöht. Auch das vermehrte Auftreten von multipolaren Spindeln lässt sich durch die aktivere Aurora A erklären.

Das beobachtete erhöhte Level an TPX2 konnte zusätzlich anhand von Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden (Abbildung 3-29 A und B), welches aber nicht die Menge an phosphorylierter Aurora A in den frühen Phasen der Mitose erklären kann. Mittels Re-expression von RITA wt in depletierten Zellen, aber nicht RITA  $\Delta$ tub, konnte das Level an p-Aurora A wieder auf das Level von Kontrollzellen reduziert werden (Abbildung 3-29 C und D). Dabei zeigte die  $\Delta$ tub Mutante keine Reduktion. Die beobachteten Chromosomen Defekte nach Depletion lassen sich teilweise durch die Erhöhung von der aktiven Aurora A erklären. Um dies genauer zu untersuchen, wurde zusätzlich der spezifische Inhibitor MLN8054 verwendet. Es zeigte sich, dass die mitotischen Defekte in Zellen ohne RITA durch die Zugabe von einer niedrigen Dosis dieses Inhibitors wieder reduziert werden können (Abbildung 3-30 und Abbildung 3-31). Bevor die Kernmembran degradiert, wird Aurora A durch Ajuba aktiviert und dadurch werden Proteine wie  $\gamma$ -Tubulin, TACC/XMAP215 Komplex und andere für die MT Nukleation rekrutiert. Wenn dann die Kernmembran aufgelöst wurde, wird Aurora A durch den Ran Signalweg aktiviert, da TPX2 von  $\beta$ -Importin freigesetzt wird und somit die Lokalisation wie auch die Aktivität von Aurora A steuert (Fu et al., 2007). Inwieweit RITA in diesen Prozess involviert ist, konnte nicht geklärt werden. Es ist zu vermuten, da RITA auch an den Zentrosomen lokalisiert, dass RITA die Mikrotubuli Assemblierung moduliert. Zudem wurde berichtet, dass erhöhte Level an Aurora A/TPX2 Komplex als onkogenes Holoenzym in CIN Zellen agieren kann und somit zur Tumorgenese beiträgt (Asteriti et al., 2010). Andere Studien haben gezeigt, dass MTs für die Aktivität von Aurora B *in vitro* verantwortlich sind (Rosasco-Nitcher et al., 2008) und das Aurora B direkt MTs bindet und eindimensionale Diffusion betreibt, welches wiederum die Aktivierung und somit die Phosphorylierung von MT assoziierten Substraten beschleunigt (Noujaim et al., 2014). Damit könnten die stabilisierten MTs in Zellen ohne RITA die Bindung und Aktivität von Aurora A modulieren, wodurch es zu einer Erhöhung der MT Assemblierungsrate kommt und was letztendlich zu chromosomaler Instabilität führt (Ertych et al., 2014). Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese Hypothese zu belegen.

---

## 5 Zusammenfassung und Perspektive

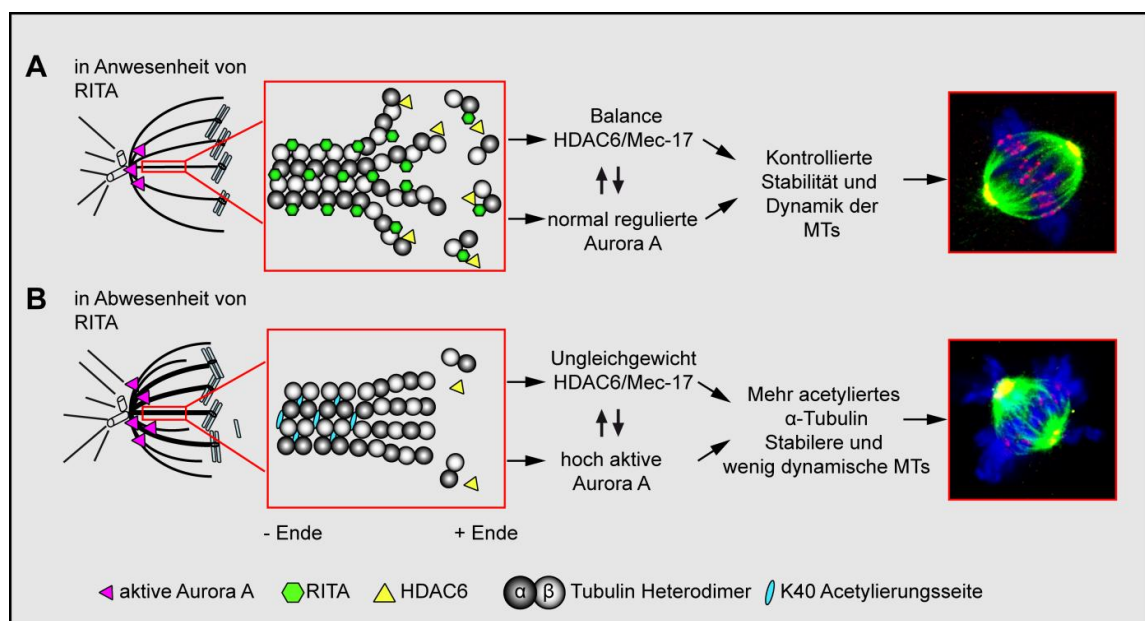
---

In der vorliegenden Dissertation wurde die Funktion von RITA in der Mitose untersucht. Neben RITAs Rolle als negativer Regulator eines aktiven Notch-Signalweges sind weitere Funktionen bisher unbekannt. Da RITA in diversen Zellzyklusphasen mit dem Zytoskelett/MTs kolokalisiert, wurde die physiologische Rolle von RITA als neues MAP in der Mitose genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass RITA in der Mitose mit diversen mitotischen MT-Strukturen kolokalisiert und dass RITA einen Einfluß auf deren Struktur hat. Somit ist das Level von RITA entscheidend für die Eigenschaften der MTs und bedarf einer genauen Kontrolle, da sonst andere MT-bindende Proteine wie Depolymerasen oder Motorproteine gestört werden können. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass RITA MTs bündelt. *In vivo* sowie *in vitro* konnte deutlich gezeigt werden, dass RITA an der Oberfläche der MTs lokalisiert. RITA wurde vorwiegend in der zytoplasmatischen Fraktion während der Pro- und Prometaphase gefunden und eine geringe Menge im Kern in der G1/S-Phase. Da RITA für den Export von RBPJ zuständig ist, kann vermutet werden, dass dieser Prozess hauptsächlich in der G1/S-Phase stattfindet. Die von Wacker *et. al.* publizierte *in vitro* Interaktion zwischen RITA und  $\alpha$ -Tubulin konnte in dieser Dissertation auch *in vivo* bestätigt werden.

Zusätzlich wurde der Einfluss der Depletion von RITA auf den Zellzyklus näher betrachtet. Dabei zeigten Zellen ohne RITA erhebliche Probleme mit dem Durchlaufen der Mitose. *Time-lapse* Mikroskopie Analysen ergaben, dass Zellen ohne RITA für das Durchlaufen länger benötigen als Kontrollzellen. Genauere Analysen ergaben eine signifikant verlängerte Prometa- und Metaphase. In diesen Analysen konnten auch vermehrt Chromosomendefekte und multipolare Spindeln beobachtet. Zusätzlich beobachtete Phänotypen waren verkürzte Spindeln und ein verkürzter interzentromerer Abstand. Durch die Reexpression von exogenem RITA wt, aber nicht RITA  $\Delta$ tub, konnten die Phänotypen wieder behoben werden. Die  $\Delta$ tub Mutante zeigte dabei noch mehr Defekte. Somit ist die Tubulin-Bindungsdomäne für die Funktion von RITA wichtig. Zusätzlich wurde die MT-Dynamik in An- und Abwesenheit von RITA untersucht. Dabei zeigte sich, dass Zellen ohne RITA eine höhere MT-Dichte, explizit vermehrt polymerisiertes  $\alpha$ -Tubulin aufwiesen. In Abwesenheit von RITA, zeigten Zellen eine gestörte MT-Dynamik, welche sich durch die erhöhte MT-Dichte erklären läßt. Die Analyse der Kinetochor-MTs ergab, dass diese in Zellen ohne RITA weitaus stabiler waren. Bei Untersuchung der Tubulin Postmodifikation zeigte sich, dass acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin in Abwesenheit von RITA signifikant erhöht war. Dies spricht für ein stabilisiertes MT-Netzwerk in der Mitose. Für diesen Phänotyp ist wiederum die Tubulin-

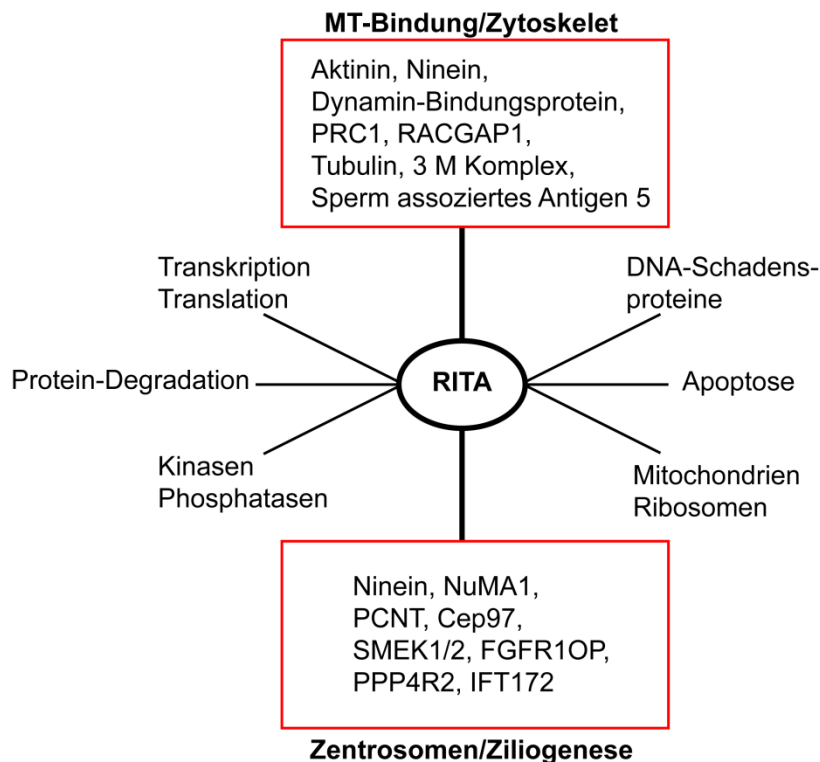
Bindungsdomäne wichtig, da durch das Wiedereinbringen von RITA wt, nicht aber der  $\Delta tub$  Mutante, das Level des acetylierten  $\alpha$ -Tubulin wieder auf das Ausgangsniveau gesenkt werden konnte. Da die Postmodifikation der Tubulin Acetylierung durch die Enzyme HDAC6 (Deacetylase) und Mec-17 (Acetylase) gesteuert werden, wurden diese beiden Enzyme näher betrachtet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression sowie die Depletion von RITA die Assoziation der beiden Enzyme mit den MTs veränderte. In beiden Fällen konnte eine verringerte HDAC6/MT Assoziation und eine erhöhte Mec-17/MT Assoziation beobachtet werden. Anhand von Immunpräzipitationen wurde HDAC6 in einem Komplex mit RITA und  $\alpha$ -Tubulin gefunden, wobei die  $\Delta tub$  Mutante zu einer geringeren Assoziation von HDAC6 mit  $\alpha$ -Tubulin führte. Die Depletion von RITA verhinderte diese Komplex-Bildung von HDAC6 mit  $\alpha$ -Tubulin jedoch. Diese Ergebnisse konnten auch *in vitro* bestätigt werden.

Bei der Suche nach weiteren Gründen für die beobachteten Chromosomendefekte wurde die Aurora A Kinase näher betrachtet. Nach Depletion von RITA konnte gezeigt werden, dass die aktive phosphorylierte Form (Thr288) dieser Kinase erhöht war. Zudem war einer der Koaktivatoren von Aurora A, TPX2, in der Prometaphase leicht erhöht. Nicht-aktive Aurora A war dagegen nicht verändert. Somit kann das verstärkte Auftreten der aktiven Aurora A teilweise die Chromosomendefekte erklären. Durch Verwendung des spezifischen Aurora A Inhibitors MLN8054 konnten diese Defekte nach Depletion von RITA teilweise wieder reduziert werden. In der Abbildung 5-1 sind die gewonnenen Erkenntnisse zusammengefasst. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass RITA die MT-Dynamik beeinflusst und die Expression von RITA präzise reguliert sein muss.



**Abbildung 5-1:** Schematische Darstellung des Einflusses von RITA in der Mitose auf die MTs. (A) Zellen mit RITA zeigen einen normalen Phänotyp mit balanciertem HDAC6, Mec-17, p-Aurora A und acetyliertem Tubulin. (B) Zellen ohne RITA zeigen ein Ungleichgewicht an HDAC6/Mec-17, mehr p-Aurora A und vermehrtes acetyliertes Tubulin, und somit vermehrt mitotische Defekte.

Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle von RITA im Zusammenhang mit dem Zellzyklus, der MT-Dynamik und dem Notch-Signalweg genauer zu klären. Auch ob RITA als MAP eine von der Phosphorylierung abhängige Lokalisation zeigt, wäre interessant zu untersuchen. Da aus eigenen Arbeiten bekannt ist, dass RITA von Cdk1 und Plk1, zwei wichtige mitotische Kinasen, phosphoryliert wird, wäre die Analyse dieser Phospho-Stellen wichtig. Auch die Beobachtungen, dass RITA an den Zentrosomen und dem primären Zilium lokalisiert, lässt auf eine mögliche Rolle in der Zentrosomentrennung und der Ziliogenese schließen. Anhand von Massenspektrometrie Daten, konnten bereits einige interessante Interaktionspartner von RITA aus diversen Signalwegen gefunden werden (Abbildung 5-2).



**Abbildung 5-2:** Interaktionspartner von RITA anhand von Massenspektrometrie Daten. Unterschieden nach Signalweg bzw. Proteinklasse. Nächste Untersuchungen der MT-bindenden und der Zentrosom bzw. Ziliogenese Proteine.

Durch das Wissen der Interaktionspartner kann die molekulare Funktion von RITA in Zukunft noch besser aufgeklärt werden. Des Weiteren soll die Expression von RITA in primärem Tumorgewebe näher untersucht werden. Die Charakterisierung der RITA KO Mäuse wird weitere Erkenntnisse über die Rolle von RITA in der Tumorgenese aufdecken. Erste Vorversuche zeigten, dass RITA in diversen Brustkrebszelllinien unterschiedlich exprimiert

---

wird. Somit wäre es interessant die Funktion von RITA, in Bezug auf das Migrations- bzw. Invasionsverhalten in diesen Krebszelllinien genauer zu betrachten. Vorläufige Immunhistologische Analysen von Analkarzinomproben zeigten, das RITA im Tumorgewebe exprimiert wird und das eine erhöhte Expression von RITA das Ansprechen auf die Radiologische Therapie verringert. Durch die Analyse des Tumorgewebes können weitere Rückschlüsse auf das Expressionsverhalten, genauer ob Über- oder Unterexpression vorherrscht, gewonnen werden. Durch diese Erkenntnisse können dann der Einfluss der Expression von RITA auf die Anwendung von Chemotherapeutika, insbesondere die Anwendung der Mikrotubuli-bindenden Agenzien und Radiologischen Behandlungen näher untersucht und verstanden werden.

---

## 6 Literatur

---

Akella, J.S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N.G., Lyons-Abbott, S., Morrisette, N.S., Dougan, S.T., Kipreos, E.T., and Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467, 218–222.

Akhmanova, A., and Steinmetz, M.O. (2010). Microtubule+ TIPs at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 3415–3419.

Al-Bassam, J., Kim, H., Brouhard, G., van Oijen, A., Harrison, S.C., and Chang, F. (2010). CLASP promotes microtubule rescue by recruiting tubulin dimers to the microtubule. *Dev. Cell* 19, 245–258.

Alexander, J.E., Hunt, D.F., Lee, M.K., Shabanowitz, J., Michel, H., Berlin, S.C., MacDonald, T.L., Sundberg, R.J., Rebhun, L.I., and Frankfurter, A. (1991). Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 4685–4689.

Alfaro-Aco, R., and Petry, S. (2015). Building the microtubule cytoskeleton piece by piece. *J. Biol. Chem.* 290, 17154–17162.

Asteriti, I.A., Rensen, W.M., Lindon, C., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2010). The Aurora-A/TPX2 complex: A novel oncogenic holoenzyme? *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1806, 230–239.

Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J. Exp. Med.* 79, 137–158.

Babet van der Vaart, A.A. and A.S. (2009). Regulation of microtubule dynamic instability. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 1007–1013.

Bakhoum, S.F., Genovese, G., and Compton, D.A. (2009). Deviant Kinetochore Microtubule Dynamics Underlie Chromosomal Instability. *Curr. Biol.* 19, 1937–1942.

Barr, A.R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J. Cell Sci.* 120, 2987–2996.

Barra HS, Rodriguez JA, Arce CA, C.R. (1973). A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins ( 14 C)arginine by a ribonuclease-sensitive system and ( 14 C)tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem.* 20, 97–108.

Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol. Cell* 12, 851–862.

Belmont L, Mitchison T, D.H. (1996). Catastrophic revelations about Op18/stathmin. *Trends Biochem Sci.* 21, 197–198.

- 
- Bertalan, Z., Budrikis, Z., La Porta, C.A.M., and Zapperi, S. (2015). Role of the number of microtubules in chromosome segregation during cell division. *PLoS One* 10.
- Bhat, K.M.R., and Setaluri, V. (2007). Microtubule-associated proteins as targets in cancer chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 13, 2849–2854.
- Bhattacharya, R. (2004). A Ubiquitous  $\gamma$ -tubulin Disrupts Microtubule Assembly and Inhibits Cell Proliferation. *Mol. Biol. Cell* 15, 3123–3131.
- Bieling, P., Telley, I.A., and Surrey, T. (2010). A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps. *Cell* 142, 420–432.
- Blow, J.J., and Tanaka, T.U. (2005). The chromosome cycle: coordinating replication and segregation. Second in the cycles review series. *EMBO Rep.* 6, 1028–1034.
- Bobrowska, A., Donmez, G., Weiss, A., Guarente, L., and Bates, G. (2012). SIRT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of Huntington’s disease phenotypes in vivo. *PLoS One* 7, e34805.
- Bolanos-Garcia, V.M., and Blundell, T.L. (2011). BUB1 and BUBR1: Multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem. Sci.* 36, 141–150.
- Brouhard, G.J., and Rice, L.M. (2014). The contribution of  $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* 207, 323–334.
- Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A. (2008). XMAP215 Is a Processive Microtubule Polymerase. *Cell* 132, 79–88.
- Buée, L., Bussière, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 33, 95–130.
- Bulinski, J.C., and Borisy, G.G. (1980). Microtubule-associated proteins from cultured HeLa cells. Analysis of molecular properties and effects on microtubule polymerization. *J Biol Chem* 255, 11570–11576.
- Cai, S., O’Connell, C.B., Khodjakov, A., and Walczak, C.E. (2009a). Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* 11, 832–838.
- Cai, S., Weaver, L.N., Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2009b). Kinesin-14 family proteins HSET/XCTK2 control spindle length by cross-linking and sliding microtubules. *Mol. Biol. Cell* 20, 1348–1359.
- Carmena, M., Ruchaud, S., and Earnshaw, W.C. (2009). Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 796–805.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 789–803.



- 
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J. V., and Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325, 834–840.
- Civelekoglu-Scholey, G., and Cimini, D. (2014). Modelling chromosome dynamics in mitosis: a historical perspective on models of metaphase and anaphase in eukaryotic cells. *Interface Focus* 4, 20130073.
- Compton, D.A. (2000). Spindle Assembly in Animal Cells. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 95–114.
- Crosio, C., Fimia, G.M., Loury, R., Kimura, M., Okano, Y., Zhou, H., Sen, S., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell. Biol.* 22, 874–885.
- Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83–117.
- Van Dijk, J., Rogowski, K., Miro, J., Lacroix, B., Eddé, B., and Janke, C. (2007). A Targeted Multienzyme Mechanism for Selective Microtubule Polyglutamylation. *Mol. Cell* 26, 437–448.
- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T.J., Meniel, V., Clarke, A., and Näthke, I.S. (2007). Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J. Cell Biol.* 176, 183–195.
- Ebneth, A., Drewes, G., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1999). Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* 44, 209–224.
- Eddé, B., Rossier, J., Le Caer, J.P., Desbruyères, E., Gros, F., and Denoulet, P. (1990). Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247, 83–85.
- Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2010). Kinesin-13s in mitosis: Key players in the spatial and temporal organization of spindle microtubules. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 276–282.
- Ertych, N., Stolz, A., Stenzinger, A., Weichert, W., Kaulfuß, S., Burfeind, P., Aigner, A., Wordeman, L., and Bastians, H. (2014). Increased microtubule assembly rates influence chromosomal instability in colorectal cancer cells. *Nat. Cell Biol.* 16, 779–791.
- Flemming, W. (1882). *Zellsubstanz, kern und zelltheilung*. F.C.W. Vogel, Leipzig, 419.
- De Forges, H., Bouissou, A., and Perez, F. (2012). Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 266–274.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* 190, 363–375.
- Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., and Zhang, C. (2007). Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.* 5, 1–10.

- Gadde, S., and Heald, R. (2004). Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol.* *14*.
- Gan, P.P., McCarroll, J.A., Po'uha, S.T., Kamath, K., Jordan, M.A., and Kavallaris, M. (2010). Microtubule dynamics, mitotic arrest, and apoptosis: drug-induced differential effects of betaIII-tubulin. *Mol. Cancer Ther.* *9*, 1339–1348.
- Gao, Y.S., Hubbert, C.C., and Yao, T.P. (2010). The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *J. Biol. Chem.* *285*, 11219–11226.
- Garrett, M.D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Curr. Sci.* *81*, 515–522.
- Garvalov, B.K., Zuber, B., Bouchet-Marquis, C., Kudryashev, M., Gruska, M., Beck, M., Leis, A., Frischknecht, F., Bradke, F., Baumeister, W., et al. (2006). Luminal particles within cellular microtubules. *J. Cell Biol.* *174*, 759–765.
- Gary J. Gorbsky (2001). The mitotic spindle checkpoint. *Curr. Biol.* *11*, R1001–R1004.
- Gatlin, J.C., and Bloom, K. (2010). Microtubule motors in eukaryotic spindle assembly and maintenance. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 248–254.
- Gergely, F. (2002). Centrosomal TACCtics. *BioEssays* *24*, 915–925.
- Giet, R., Uzbekov, R., Cubizolles, F., Le Guellec, K., and Prigent, C. (1999). The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIEg5. *J. Biol. Chem.* *274*, 15005–15013.
- Giubettini, M., Asteriti, I. a, Scrofani, J., De Luca, M., Lindon, C., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2011). Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *J. Cell Sci.* *124*, 113–122.
- Giustiniani, J., Daire, V., Cantaloube, I., Durand, G., Poüs, C., Perdiz, D., and Baillet, A. (2009). Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell. Signal.* *21*, 529–539.
- Gruss, O.J., and Vernos, I. (2004). The mechanism of spindle assembly: Functions of Ran and its target TPX2. *J. Cell Biol.* *166*, 949–955.
- Hallak ME, Rodriguez JA, Barra HS, C.R. (1977). Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. *FEBS Lett.* *73*, 147–150.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.
- Hannak, E., Oegema, K., Kirkham, M., Gönczy, P., Habermann, B., and Hyman, A.A. (2002). The kinetically dominant assembly pathway for centrosomal asters in *Caenorhabditis elegans* is  $\gamma$ -tubulin dependent. *J. Cell Biol.* *157*, 591–602.

---

He, J., Zhang, Z., Ouyang, M., Yang, F., Hao, H., Lamb, K.L., Yang, J., Yin, Y., and Shen, W.H. (2016). PTEN regulates EG5 to control spindle architecture and chromosome congression during mitosis. *Nat. Commun.* 7, 12355.

Helmke, K.J., Heald, R., and Wilbur, J.D. (2013). Interplay between spindle architecture and function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 306, 83–125.

Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P., and Allis, C.D. (1997). Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348–360.

Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585–598.

Honnappa, S., Gouveia, S.M., Weisbrich, A., Damberger, F.F., Bhavesh, N.S., Jawhari, H., Grigoriev, I., van Rijssel, F.J.A., Buey, R.M., Lawera, A., et al. (2009). An EB1-Binding Motif Acts as a Microtubule Tip Localization Signal. *Cell* 138, 366–376.

Honore, S., Pasquier, E., and Braguer, D. (2005). Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 3039–3056.

Howard, J., and Hyman, A.A. (2003). Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422, 753–758.

Howell, B., Deacon, H., and Cassimeris, L. (1999). Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 2, 3713–3722.

Howes, S.C., Alushin, G.M., Shida, T., Nachury, M. V, and Nogales, E. (2014). Effects of tubulin acetylation and tubulin acetyltransferase binding on microtubule structure. *Mol. Biol. Cell* 25, 257–266.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., and Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417, 455–458.

Ikegami, K., and Setou, M. (2009). TTLL10 can perform tubulin glycylation when co-expressed with TTLL8. *FEBS Lett.* 583, 1957–1963.

J. William Harbour and Douglas C. Dean (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393–2409.

Janke, C., and Chloë Bulinski, J. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 773–786.

Janke, C., and Kneussel, M. (2010). Tubulin post-translational modifications: Encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci.* 33, 362–372.

- Janke, C., Rogowski, K., Wloga, D., Regnard, C., Kajava, A. V., Strub, J.-M., Temurak, N., van Dijk, J., Boucher, D., van Dorsselaer, A., et al. (2005). Tubulin polyglutamylase enzymes are members of the TTL domain protein family. *Science* 308, 1758–1762.
- Kalebic, N., Martinez, C., Perlas, E., Hublitz, P., Bilbao-Cortes, D., Fiedorczuk, K., Andolfo, A., and Heppenstall, P.A. (2013). Tubulin acetyltransferase  $\alpha$ TAT1 destabilizes microtubules independently of its acetylation activity. *Mol. Cell. Biol.* 33, 1114–1123.
- Kapoor, T.M., Lampson, M. a, Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E.D., McEwen, B.F., and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* 311, 388–391.
- Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* 10, 194–204.
- Khawaja S, Gundersen GG, B.J. (1988). Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level. *J Cell Biol.* 106, 141–149.
- Kimura, Y., Kurabe, N., Ikegami, K., Tsutsumi, K., Konishi, Y., Kaplan, O.I., Kunitomo, H., Iino, Y., Blacque, O.E., and Setou, M. (2010). Identification of tubulin deglutamylase among *Caenorhabditis elegans* and mammalian cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *J. Biol. Chem.* 285, 22936–22941.
- Kirschner MW, M.T. (1986). Microtubule dynamics. *Nature* 324.
- Komarova, Y.A., Akhmanova, A.S., Kojima, S.I., Galjart, N., and Borisy, G.G. (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol.* 159, 589–599.
- Komarova, Y.A., Lansbergen, G., Galjart, N., Grosveld, F., Borisy, G.G., and Akhmanova, A.S. (2005). EB1 and EB3 control CLIP dissociation from the ends of growing microtubules. *Mol Biol Cell* 16, 5334–5345.
- L'Hernault, S.W., and Rosenbaum, J.L. (1985). *Chlamydomonas* alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24, 473–478.
- Lawler, S. (1998). Microtubule dynamics: if you need a shrink try stathmin/Op18. *Curr. Biol.* 8, R212–R214.
- Lüders, J., Patel, U.K., and Stearns, T. (2006). GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nat. Cell Biol.* 8, 137–147.
- Ludueña, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int. Rev. Cytol.* 178, 207–275.
- Ma, N., Titus, J., Gable, A., Ross, J.L., and Wadsworth, P. (2011). TPX2 regulates the localization and activity of Eg5 in the mammalian mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 195, 87–98.
- Magiera, M.M., and Janke, C. (2013). Investigating tubulin posttranslational modifications with specific antibodies. *Methods Cell Biol.* 115, 247–267.

- 
- Maiato, H., Sampaio, P., and Sunkel, C.E. (2004). Microtubule-associated proteins and their essential roles during mitosis. *Int. Rev. Cytol.* *241*, 53–153.
- Manfredi, M.G., Ecsedy, J. a, Meetze, K. a, Balani, S.K., Burenkova, O., Chen, W., Galvin, K.M., Hoar, K.M., Huck, J.J., LeRoy, P.J., et al. (2007). Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4106–4111.
- Marumoto, T., Zhang, D., and Saya, H. (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 42–50.
- Maruta, H., Greer, K., and Rosenbaum, J.L. (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J. Cell Biol.* *103*, 571–579.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., et al. (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* *21*, 6820–6831.
- Meunier, S., and Vernos, I. (2011). K-fibre minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1406–1414.
- Michelle D. Garrett (2001). Cell cycle control and cancer. *Curr. Sci.* *81*, 515–522.
- Mitchison T, K.M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* *312*, 237–242.
- Mollinari, C., Kleman, J.P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J. Cell Biol.* *157*, 1175–1186.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 261–291.
- Murray, W. (1992). Creative blocks: cell-cycle checkpoints and feedback controls. *Nature* *359*, 599–604.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 379–393.
- Nam, H.-J., and van Deursen, J.M. (2014). Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nat. Cell Biol.* *16*, 538–549.
- Newton, C.N., Wagenbach, M., Ovechkina, Y., Wordeman, L., and Wilson, L. (2004). MCAK, a Kin I kinesin, increases the catastrophe frequency of steady-state HeLa cell microtubules in an ATP-dependent manner in vitro. *FEBS Lett.* *572*, 80–84.
- Nguyen, H.L., Gruber, D., and Bulinski, J.C. (1999). Microtubule-associated protein 4 (MAP4) regulates assembly, protomer-polymer partitioning and synthesis of tubulin in cultured cells. *J. Cell Sci.* *112* ( Pt 1), 1813–1824.
- Nigg, E.A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* *17*, 471–480.

- 
- Nigg, E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat. Rev. Cancer* 2, 815–825.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M., and Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell* 11, 437–444.
- Noujaim, M., Bechstedt, S., Wicczorek, M., and Brouhard, G.J. (2014). Microtubules accelerate the kinase activity of Aurora-B by a reduction in dimensionality. *PLoS One* 9.
- Ohkawa, N., Sugisaki, S., Tokunaga, E., Fujitani, K., Hayasaka, T., Setou, M., and Inokuchi, K. (2008). N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes to Cells* 13, 1171–1183.
- Pardee, B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 1286–1290.
- Parker, A.L., Kavallaris, M., and McCarroll, J.A. (2014). Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front. Oncol.* 4, 153.
- Pasquier, E., and Kavallaris, M. (2008). Microtubules: A dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life* 60, 165–170.
- Paturle L, Wehland J, Margolis RL, J.D. (1989). Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and nontyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. *Biochemistry* 28, 2698–2704.
- Paturle-Lafanechère, L., Manier, M., Trigault, N., Pirollet, F., Mazarguil, H., and Job, D. (1994). Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J. Cell Sci.* 107 ( Pt 6, 1529–1543.
- Perdiz, D., Mackeh, R., Poüs, C., and Baillet, A. (2011). The ins and outs of tubulin acetylation: More than just a post-translational modification? *Cell. Signal.* 23, 763–771.
- Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R., and Kreis, T.E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* 96, 517–527.
- Peris, L., Wagenbach, M., Lafanechère, L., Brocard, J., Moore, A.T., Kozielski, F., Job, D., Wordeman, L., and Andrieux, A. (2009). Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J. Cell Biol.* 185, 1159–1166.
- Pines, J., and Hunter, T. (1991). Human Cyclin-a and Cyclin-B1 Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell-Cycle Dependent Nuclear Transport. *J. Cell Biol.* 115, 1–17.
- Piperno, G., LeDizet, M., and Chang, X.J. (1987). Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* 104, 289–302.
- Prigent, C., and Dimitrov, S. (2003). Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell Sci.* 116, 3677–3685.
- Redeker, V., Levilliers, N., Schmitter, J.M., Le Caer, J.P., Rossier, J., Adoutte, A., and Bré, M.H. (1994). Polyglycylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 266, 1688–1691.

- 
- Ritter, A., Sanhaji, M., Steinhäuser, K., Roth, S., Louwen, F., and Yuan, J. (2015). The activity regulation of the mitotic centromere-associated kinesin by Polo-like kinase 1. *Oncotarget* 6, 6641–6655.
- Rogowski, K., Juge, F., van Dijk, J., Wloga, D., Strub, J.M., Levilliers, N., Thomas, D., Bré, M.H., Van Dorsselaer, A., Gaertig, J., et al. (2009). Evolutionary Divergence of Enzymatic Mechanisms for Posttranslational Polyglycylation. *Cell* 137, 1076–1087.
- Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M.M., Bosc, C., Deloulme, J.C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N.D., Lacroix, B., Grau, M.B., et al. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell* 143, 564–578.
- Rosasco-Nitcher, S.E., Lan, W., Khorasanizadeh, S., and Stukenberg, P.T. (2008). Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science* 319, 469–472.
- Rouzier, R., Rajan, R., Wagner, P., Hess, K.R., Gold, D.L., Stec, J., Ayers, M., Ross, J.S., Zhang, P., Buchholz, T. a, et al. (2005). Microtubule-associated protein tau: a marker of paclitaxel sensitivity in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8315–8320.
- Rubinstein, B., Larripa, K., Sommi, P., and Mogilner, A. (2009). The elasticity of motor-microtubule bundles and shape of the mitotic spindle. *Phys. Biol.* 6, 016005.
- Rudolf Virchow (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung und in ihrer Auswirkung auf die physiologische und pathologische Gewebelehre* (Berlin: Verlag A. Hirschwald).
- Saffin, J.-M., Venoux, M., Prigent, C., Espeut, J., Poulat, F., Giorgi, D., Abrieu, A., and Rouquier, S. (2005). ASAP, a human microtubule-associated protein required for bipolar spindle assembly and cytokinesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11302–11307.
- Sanhaji, M., Ritter, A., Belsham, H.R., Friel, C.T., Roth, S., Louwen, F., and Yuan, J. (2014). Polo-like kinase 1 regulates the stability of the mitotic centromere-associated kinesin in mitosis. *Oncotarget* 5, 3130–3144.
- Sardon, T., Peset, I., Petrova, B., and Vernos, I. (2008). Dissecting the role of Aurora A during spindle assembly. *EMBO J.* 27, 2567–2579.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6, 209–217.
- Scholey, J.M., Neighbors, B., McIntosh, J.R., and Salmon, E.D. (1984). Isolation of microtubules and a dynein-like MgATPase from unfertilized sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 259, 6516–6525.
- Schulze E, Asai DJ, Bulinski JC, K.M. (1987). Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol.* 105, 2167–2177.
- Schwarz, P.M., Liggins, J.R., and Luduena, R.F. (1998). Beta-Tubulin isotypes purified from bovine brain have different relative stabilities. *Biochemistry* 37, 4687–4692.

---

Sharma, N., Kosan, Z.A., Stallworth, J.E., Berbari, N.F., and Yoder, B.K. (2011). Soluble levels of cytosolic tubulin regulate ciliary length control. *Mol. Biol. Cell* 22, 806–816.

Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407, 41–47.

Shida, T., Cueva, J.G., Xu, Z., Goodman, M.B., and Nachury, M. V (2010). The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21517–21522.

Sirajuddin, M., Rice, L.M., and Vale, R.D. (2014). Regulation of microtubule motors by tubulin isotypes and post-translational modifications. *Nat. Cell Biol.* 16, 335–344.

Skibbens, R. V., Skeen, V.P., and Salmon, E.D. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: A push-pull mechanism. *J. Cell Biol.* 122, 859–875.

Solinger, J.A., Paolinelli, R., Klöss, H., Scorza, F.B., Marchesi, S., Sauder, U., Mitsushima, D., Capuani, F., Stürzenbaum, S.R., and Cassata, G. (2010). The *Caenorhabditis elegans* Elongator complex regulates neuronal alpha-tubulin acetylation. *PLoS Genet.* 6, e1000820.

Song, Y., and Brady, S.T. (2015). Post-translational modifications of tubulin: Pathways to functional diversity of microtubules. *Trends Cell Biol.* 25, 125–136.

Soppina, V., Herbstman, J.F., Skinotis, G., and Verhey, K.J. (2012). Luminal Localization of alpha-tubulin K40 Acetylation by Cryo-EM Analysis of Fab-Labeled Microtubules. *PLoS One* 7.

Soucek, K., Kamaid, A., Phung, A.D., Kubala, L., Bulinski, J.C., Harper, R.W., and Eiserich, J.P. (2006). Normal and prostate cancer cells display distinct molecular profiles of alpha-tubulin posttranslational modifications. *Prostate* 66, 954–965.

Steinhäuser, K., Klöble, P., Kreis, N.-N., Ritter, A., Friemel, A., Roth, S., Reichel, J.M., Michaelis, J., Rieger, M.A., Louwen, F., et al. (2016). Deficiency of RITA results in multiple mitotic defects by affecting microtubule dynamics. *Oncogene* 1–14.

Sudo, H., and Baas, P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *J. Neurosci.* 30, 7215–7226.

Sun, X., Li, D., Yang, Y., Ren, Y., Li, J., Wang, Z., Dong, B., Liu, M., and Zhou, J. (2012). Microtubule-binding protein CLIP-170 is a mediator of paclitaxel sensitivity. *J. Pathol.* 226, 666–673.

Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T., and Honjo, T. (1995). Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J $\kappa$ /Su(H). *Curr. Biol.* 5, 1416–1423.

Taya, Y. (1997). RB kinases and RB-binding proteins: New points of view. *Trends Biochem. Sci.* 22, 14–17.



- 
- Vasquez, R.J., Howell, B., Yvon, A.M., Wadsworth, P., and Cassimeris, L. (1997). Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol. Biol. Cell* 8, 973–985.
- Vassilev, L.T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D.C., and Chen, L. (2006). Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10660–10665.
- Verhey, K.J., and Gaertig, J. (2007). The tubulin code. *Cell Cycle* 6, 2152–2160.
- Wacker, S.A., Alvarado, C., von Wichert, G., Knippschild, U., Wiedenmann, J., Clauss, K., Nienhaus, G.U., Hameister, H., Baumann, B., Borggrefe, T., et al. (2011). RITA, a novel modulator of Notch signalling, acts via nuclear export of RBP-J. *EMBO J.* 30, 43–56.
- Webster, D.R., and Borisy, G.G. (1989). Microtubules are acetylated in domains that turn over slowly. *J. Cell Sci.* 92 ( Pt 1), 57–65.
- Wei, Y., Mizzen, C. a, Cook, R.G., Gorovsky, M. a, and Allis, C.D. (1998). Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7480–7484.
- Westermann, S., and Weber, K. (2003). Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 938–947.
- Whipple, R.A., Matrone, M.A., Cho, E.H., Balzer, E.M., Vitolo, M.I., Yoon, J.R., Ioffe, O.B., Tuttle, K.C., Yang, J., and Martin, S.S. (2010). Epithelial-to-mesenchymal transition promotes tubulin detyrosination and microtentacles that enhance endothelial engagement. *Cancer Res.* 70, 8127–8137.
- Wilson, P.G., and Borisy, G.G. (1997). Evolution of the multi-tubulin hypothesis. *Bioessays* 19, 451–454.
- Wittmann, T., Hyman, A.A., and Desai, A. (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* 3, E28–E34.
- Wloga, D., Webster, D.M., Rogowski, K., Bré, M.H., Levilliers, N., Jerka-Dziadosz, M., Janke, C., Dougan, S.T., and Gaertig, J. (2009). TTLL3 Is a Tubulin Glycine Ligase that Regulates the Assembly of Cilia. *Dev. Cell* 16, 867–876.
- Wu, G., Lin, Y.-T., Wei, R., Chen, Y., Shan, Z., and Lee, W.-H. (2008). Hice1, a novel microtubule-associated protein required for maintenance of spindle integrity and chromosomal stability in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3652–3662.
- Young, S., Besson, S., and Welburn, J.P.I. (2014). Length-dependent anisotropic scaling of spindle shape. *Biol. Open* 3, 1217–1223.
- Yount, A.L., Zong, H., and Walczak, C.E. (2015). Regulatory mechanisms that control mitotic kinesins. *Exp. Cell Res.* 334, 70–77.
- Zhang, D., Rogers, G.C., Buster, D.W., and Sharp, D.J. (2007). Three microtubule severing enzymes contribute to the “Pacman- flux” machinery that moves chromosomes. *J. Cell Biol.* 177, 231–242.

---

Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S.I., and Iwase, H. (2004). HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *10*, 6962–6968.

Zilberman, Y., Ballestrem, C., Carramusa, L., Mazitschek, R., Khochbin, S., and Bershadsky, A. (2009). Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J. Cell Sci.* *122*, 3531–3541.

---

## 7 Verzeichnisse

---

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

---

<b>Abbildung 1-1:</b> Die Phasen des Zellzyklus im Überblick .....	1
<b>Abbildung 1-2:</b> Schematischer Aufbau der mitotischen Spindel. ....	5
<b>Abbildung 1-3:</b> Schematische Darstellung der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli.....	8
<b>Abbildung 1-4:</b> Schematische Darstellung des $\alpha$ - $\beta$ -Tubulin Dimers mit den dazugehörigen Modifikationen. ....	10
<b>Abbildung 1-5:</b> RITA ist ein evolutionär konserviertes Protein.....	14
<b>Abbildung 1-6:</b> Schematische Darstellung der Domänen innerhalb RITA.. ....	15
<b>Abbildung 3-1:</b> RITA lokalisiert an die mitotischen Spindel.....	39
<b>Abbildung 3-2:</b> Im <i>In vitro</i> Depolymerisation <i>assay</i> werden MTs durch RITA gebündelt. ....	40
<b>Abbildung 3-3:</b> RITA ist im Zellzyklus exprimiert.....	41
<b>Abbildung 3-4:</b> RITA ist im Zytoplasma lokalisiert und bindet an $\alpha$ -Tubulin. ....	42
<b>Abbildung 3-5:</b> Die Depletion von RITA beeinflusst die Zellzyklusprogression. ....	43
<b>Abbildung 3-6:</b> Zellen ohne RITA treten langsamer aus der Mitose aus. ....	44
<b>Abbildung 3-7:</b> HeLa-Zellen zeigen eine verlängerte Mitose in Abwesenheit von RITA. ....	46
<b>Abbildung 3-8:</b> Fehlerhafte Chromosomenanordnung nach Depletion von RITA. ....	47
<b>Abbildung 3-9:</b> Mitotische Defekte und Multipolarität in HeLa Zellen ohne RITA.....	48
<b>Abbildung 3-10:</b> Mitotische Defekte und Multipolarität in HCT116 Zellen ohne RITA.....	49
<b>Abbildung 3-11:</b> Verkürzter Zentromerabstand in RITA depletierten HeLa Zellen.. ....	50
<b>Abbildung 3-12:</b> Die Lokalisation von Aurora B ist nicht negativ beeinflusst in Abwesenheit von RITA. ....	51
<b>Abbildung 3-13:</b> Mitotischen Defekte in RITA KO und RITA +/- MEFs. ....	52
<b>Abbildung 3-14:</b> Wildtyp RITA aber nicht RITA $\Delta$ tub reduziert die mitotische Defekte nach Depletion.. ....	53
<b>Abbildung 3-15:</b> Erhöhtes polymerisiertes Tubulin-Level und verkürzter Pol-Abstand in Zellen ohne RITA. ....	54
<b>Abbildung 3-16:</b> Reduzierte MT Dynamik in Zellen ohne RITA. ....	56
<b>Abbildung 3-17:</b> Erhöhte MT-Dichte und deregulierte MT-Dynamik in RITA KO MEFs.. ....	57
<b>Abbildung 3-18:</b> Erhöhte Stabilität der k-MTs. ....	58
<b>Abbildung 3-19:</b> Erhöhtes acetyliertes $\alpha$ -Tubulin-Level in Zellen ohne RITA.. ....	59
<b>Abbildung 3-20:</b> RITA kolokalisiert teils mit acetyliertem $\alpha$ -Tubulin.....	60
<b>Abbildung 3-21:</b> Wild-Type RITA, nicht aber RITA $\Delta$ tub reduziert das Level an acetyliertem $\alpha$ -Tubulin.....	62
<b>Abbildung 3-22:</b> Wild-Type RITA, nicht aber RITA $\Delta$ tub reduziert das Level an $\alpha$ -Tubulin und korrigieren den <i>pole-to-pole</i> Abstand. ....	63
<b>Abbildung 3-23:</b> Weniger MT assoziiertes HDAC6 in RITA überexprimierenden Zellen.....	64
<b>Abbildung 3-24:</b> RITA fördert die Bindung von HDAC6 mit $\alpha$ -Tubulin. ....	65
<b>Abbildung 3-25:</b> Depletion von RITA beeinflusst HDAC6 und Mec-17 an den MTs .....	66
<b>Abbildung 3-26:</b> RITA fördert HDAC6/MT Komplexbildung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	67
<b>Abbildung 3-27:</b> Erhöhte aktive Aurora A in Zellen ohne RITA.....	68
<b>Abbildung 3-28:</b> Depletion von RITA erhöht exklusiv die phosphorylierte Form von Aurora A, nicht aber Aurora A. ....	69
<b>Abbildung 3-29:</b> Erhöhtes Level an TPX2 und rescue mit Wildtyp RITA, nicht aber RITA $\Delta$ tub, reduzieren p- Aurora A. ....	70
<b>Abbildung 3-30:</b> Inhibition von Aurora A reduziert mitotische Defekte in Zellen ohne RITA. ....	71
<b>Abbildung 3-31:</b> Reduktion der Chromosomen Defekte in RITA depletierten Zellen nach Behandlung mit MLN8054.. ....	72
<b>Abbildung 5-1:</b> Schematische Darstellung des Einflusses von RITA in der Mitose auf die MTs. ....	88
<b>Abbildung 5-2:</b> Interaktionspartner von RITA anhand von Massenspektrometrie Daten. ....	88

---

## 7.2 Tabellenverzeichnis

---

<b>Tabelle 1:</b> Auflistung der verwendeten Enzyme.....	<b>24</b>
<b>Tabelle 2:</b> Auflistung der verwendeten Antikörper. ....	<b>24</b>
<b>Tabelle 3:</b> Auflistung der verwendeten Zelllinien. ....	<b>25</b>
<b>Tabelle 4:</b> Auflistung der verwendeten siRNAs. ....	<b>26</b>
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete DNA-Konstrukte. ....	<b>28</b>
<b>Tabelle 6:</b> Ansätze zur Transfektion von siRNA in verschiedene Zellkulturschal- Größen. ....	<b>32</b>

---

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

---

APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Bovine Serumalbumin
CHX	Cycloheximid
Cy3/5	Cyanin 3/5
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescent Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced GFP
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat GFP grün fluoreszierendes Protein
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horse-radish-peroxidase)
LB	lysogeny broth
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure N
Noc	Nocodazol
NaAc	Natriumacetat
NP-40	Nonyl-Phenoxypolyethoxylethanol-40
PBS(T)	Phosphate Buffered Saline (Tween-20)
PFA	Paraformaldehyd PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SOB	super optimal broth
T	Thymin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
μ	Mikro
bp	Basenpaar(e)
Ci	Curie
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde(n)
k	Kilo
l	Liter
m	Meter oder Milli
M	Molar
min	Minute(n)
n	Nano
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen Aktivität
RLU	relative light units
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
sec	Sekunde
U	Unit(s) (Einheit der Umsatzrate von Enzymen)
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
ACA	Anti-Centromere Antikörper
ad	auf
ATP	Adenosin-Triphosphat

---

Cdk	cyclin-dependent kinase
cDNA	complementary DNA
dNTPs	Desoxyribonucleotid-Triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
E. coli	Escherichia coli
FACS	fluorescence activated cell sorting
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GST	Glutathion S-Transferase
H2B	Histon 2B
HCT116	Humane Kolon-Karzinom Zelllinie
HDAC	Histon-Deacetylase
HeLa	Humane Cervix-Karzinom-Zelllinie
IgG	Immunglobulin G
<i>in vitro</i>	im Reagenzglas
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus, einschließlich Zellkulturarbeiten
Kon	Kontrolle
KO	<i>Knock-out</i>
MEFs	Maus embryonale Fibroblasten
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	messenger RNA
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localization signal
N-Terminus	Amino-Terminus
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblaste</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	poly acryl amide gel electrophoresis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
p-HH3	phospho-Histon H3
PLA	Proximity-Ligation Assay
Plk	Polo-like Kinase
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz (RNA interference)
RT	Raumtemperatur (20-25 °C)
SAC	spindle assembly checkpoint, Spindelkontrollpunkt
siRNA	small interfering RNA
S-Phase	Synthese-Phase
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
U2OS	Humane Osteosarcoma-Zelllinie
Wt	Wildtyp
Zyto	Zytoplasma

---

## 8 Anhang

---

### 8.1 Danksagung

---

Bei Prof. Dr. Harald Kolmar möchte ich mich herzlich für die Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Dissertation im Fachbereich Biochemie der TU Darmstadt bedanken.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. med. Juping Yuan für die ausserordentliche Betreuung in theoretischer sowie praktischer Durchführung der vorliegenden Dissertation. Die vielen anregenden Diskussionen und das Erarbeiten von neuen Ideen haben das Gelingen dieser Dissertation erst möglich gemacht. Danke für diese spannende und auch herausfordernde Aufgabenstellung der letzten fünf Jahre, welche mit vielen Rückschlägen und Erfolgen verbunden waren. Danke dass mir dein Vertrauen den Rücken gestärkt hat! Mein Dank gilt auch Prof. Dr. rer. nat. Franz Oswald (Universitätsklinik Ulm) für die Bereitstellung vieler Materialien, die Durchführung der dSTORM Experimente und die Ermöglichung an diesem spannenden Thema zu arbeiten.

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Frank Louwen danke ich sehr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmittel.

Bei Susanne Roth und Brigitte Zimmer möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei vielen Versuchen bedanken und das sie immer für Fragen offen waren.

Dr. rer. nat. Michael Rieger (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) und seiner Arbeitsgruppe möchte ich danken für die Unterstützung in Bezug auf die *Time-lapse* Videomikroskopie Aufnahmen. Dr. Behrends und Jennifer Jung (Institut für Biochemie II, Goethe-Universität) für die Hilfe bei der Massenspektrometrie.

Besonders möchte ich mich bei Nina-Naomi Kreis für die stetige Unterstützung und Betreuung dieser Arbeit bedanken. Ein Großer Dank gilt auch Alexandra Friemel, Andreas Ritter, Britta Jasmer und Conny für die Unterstützung im schweren Laboralltag und die gemeinsamen Cocktail-Abende. Danke euch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an alle nicht namentlich erwähnten Mitarbeiter des Molekularbiologischen Labors, die mich in den Jahren mit nützlichen und praktischen Tipps im Laboralltag unterstützt haben.

---

Der größte Dank gilt meinen Eltern für ihre Geduld und die Ermöglichung dieser Ausbildung der letzten fünf Jahre. Traurig das mein Vater mich nicht den ganzen Weg begleiten konnte. Ich Liebe euch. Meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle auch danken, besonders Nina E., Padi, Katja L. und alle die mich begleitet haben und für ihre Geduld. Ihr habt meine Launen während der langen Zeit ertragen und mich stets unterstützt.



---

## 8.2 Eidesstattliche Erklärung

---

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation

mit dem Titel: „**Funktion und Regulation des neuen Tubulin-assoziierten Proteins RITA**“

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigelegte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigelegte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

1. **Steinhäuser K**, Klöble P, Kreis NN, Ritter A, Friemel A, Roth S, Reichel JM, Michaelis J, Rieger MA, Louwen F, Oswald F, Yuan J. Deficiency of RITA results in multiple mitotic defects by affecting microtubule dynamics (2016). *Oncogene*, In press.
2. Muschol-Steinmetz C, Jasmer B, Kreis NN, **Steinhäuser K**, Ritter A, Rolle U, Yuan J, Louwen F. B-cell lymphoma 6 promotes proliferation and survival of trophoblastic cells (2016). *Cell Cycle*, **16**, 827-839.
3. Ritter A\*, Sanhaji M\*, **Steinhäuser K**, Roth S, Louwen F, Yuan J. The activity regulation of the mitotic centromere-associated kinesin by Polo-like kinase 1 (2015). *Oncotarget*, **6**, 6641–6655. (\*Contribute equally)

### Poster Präsentationen

#### 2016

*EMBL Symposium: Microtubules: From Atoms to Complex Systems* (Heidelberg, Germany)

Poster Präsentation “**RITA, a novel regulator of microtubule dynamics**”

#### 2014

60. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (München, Germany)

Poster Präsentation “**Function and regulation of the novel tubulin- associated protein RITA in mitosis**”

#### 2014

*6th UCT Science Day* Universitätsklinikums Frankfurt (Frankfurt, Germany)

Poster Präsentation “**Function and regulation of the novel tubulin- associated protein RITA in mitosis**”

#### 2013

*5th UCT Science Day* Universitätsklinikums Frankfurt (Frankfurt, Germany)

Poster Präsentation “**Function and regulation of the novel tubulin- associated protein RITA in mitosis**”

---

## 8.4 Lebenslauf

---

### Persönliche Daten

Name	Kerstin Steinhäuser
Adresse:	Bleiweißstrasse 7, 60599 Frankfurt
■	■
■	■
■	■
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdaten:	7. September 1980 in Offenbach am Main

### Akademische Tätigkeit

15.09.2011 – 31.12.2016	Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Dissertation (TU Darmstadt, Prof. Dr. Kolmar), Universitätsklinikum Frankfurt am Main, Labor für molekulare Geburtshilfe, Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
-------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Studium

07/2010-02/2011	Diplomarbeit mit dem Thema „Generierung einer Bibliothek von Superoxiddismutase Varianten und Durchmusterung mittels <i>yeast surface display</i> “  Note 1,0
10/2003 – 07/2011	Studium im Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt  Hauptfach: Biochemie  Nebenfach: Technische Chemie  Diplomnote: 1,9

### Berufliche Qualifikation

08/2000 – 07/2003	Ausbildung zur Chemielaborantin, Aventis Frankfurt  Abschluss als Chemielaborantin (IHK)
-------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------

---

### **Schulische Ausbildung**

08/1991 – 06/2000	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife, Freiherr von Stein Gymnasium, Frankfurt, Leistungskurse: Biologie, Deutsch, Note: 2,3
09/1987 – 07/1991	Grunelius Grundschule, Frankfurt

### **Qualifikationen**

Sprachkenntnisse	Englisch in Wort und Schrift Französisch Grundkenntnisse
EDV-Kenntnisse	Word, Excel, PowerPoint, Adobe Illustrator, Photoshop, ImageJ, CellQuest, Origin
Sachkunde	Sachkunde nach § 5 Abs. 2 Chemikalien- Verbotsverordnung

